

Alfred Thanbichler

Über den Metabolismus der Hamamelose

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Alfred Thanbichler

Über den Metabolismus der Hamamelose

Von der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
angenommene Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde

Februar 1973



1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Beck

2. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Kandler

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Februar 1973

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	5
2.1.	Pflanzenmaterial	5
2.2.	Extraktion	5
2.3.	Trennverfahren	6
2.3.1.	Papierchromatographie	6
2.3.2.	Hochspannungselektrophorese	6
2.3.3.	Säulenchromatographie flüchtiger organischer Säuren	7
2.3.4.	Gaschromatographie	10
2.4.	Lokalisation von Substanzen auf den Papierchromatogrammen und Papierpherogrammen	10
2.5.	Messung der Radioaktivität	10
2.5.1.	Messung gelöster radioaktiver Substanzen	10
2.5.2.	Messung radioaktiver Substanzen auf den Papierchromatogrammen und Papierpherogrammen	11
2.5.3.	Messung von $^{14}\text{CO}_2$	11
2.6.	Darstellung von ^{14}C -uniform markierter Hamamelose	12
2.7.	Darstellung von positionsmarkierter Hamamelose	12
2.8.	Darstellung von nicht radioaktiver, kristalliner Hamamelose	15
2.9.	Applikation radioaktiver Zucker an ganze Pflanzen	15
2.10.	Inkubation von Pseudomonas H 1 mit radioaktiver Hamamelose unter Sauerstoff	17
2.11.	Durchführung der Puffervergärung von Hamamelose mit Kluysvera citrophila Stamm 627	18
2.12.	Applikation von ^{14}C -Hamamelose an Kluysvera citrophila Stamm 627 - Erstellung einer Markierungskinetik von Zwischenprodukten	18
2.13.	Rohextraktpräparation aus Kluysvera citrophila Stamm 627	19

2.14.	Perjodat-Oxidation	19
2.14.1.	Perjodat-Oxidation von Zuckeralkoholphosphaten und Isolierung der Spaltprodukte	19
2.14.2.	Perjodat-Oxidation von ^{14}C -Mannit	20
2.15.	Nährmedien	20
3.	Ergebnisse	22
3.1.	Der Umsatz von Hamamelose in höheren Pflanzen	22
3.1.1.	Vorversuche	22
3.1.2.	Vergleich des Metabolismus' von ^{14}C -Hamamelose und ^{14}C -Glucose in <i>Primula clusiana</i>	23
3.1.2.1.	Die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Pflanzenorgane, sowie auf exhalierendes CO_2 und auf Wurzelausscheidungen	24
3.1.2.2.	Die Verteilung der Radioaktivität auf einzelne Substanzen und deren Identifizierung in den Äthanol- Wasser-Extrakten	27
3.2.	Die Oxidation von Hamamelose durch <i>Pseudomonas</i> H 1	30
3.2.1.	Isolierung der Hamamelose-oxidierenden Bakterien	30
3.2.2.	Identifizierung der Bakterien	31
3.2.3.	Inkubation der Bakterien mit radioaktiver Hamamelose	31
3.2.4.	Identifizierung der Abbauprodukte	35
3.2.5.	In vitro-Versuche zur Oxidation von Hamamelose	39
3.3.	Die aerobe und anaerobe Dissimilation von Hamame- lose durch <i>Kluyvera citrophila</i> Stamm 627	40
3.3.1.	Die Isolierung von Hamamelose-dissimilierenden Bakterien	40
3.3.2.	Identifizierung der Bakterien	41
3.3.3.	Die aerobe Dissimilation von Hamamelose durch <i>Kluyvera citrophila</i> Stamm 627	44
3.3.4.	Die Vergärung der Hamamelose	47
3.3.4.1.	Wachstum der Bakterien im Hochagar	47
3.3.4.2.	Puffervergärung von Hamamelose	47

3.3.4.3.	Prüfung auf Gärungsprodukte	49
3.3.4.3.1.	Identifizierung der flüchtigen neutralen Substanz	49
3.3.4.3.2.	Identifizierung der bei der Gärung entstehenden Säuren	49
3.3.5.	Der Abbauweg der Hamamelose in <i>Kluyvera citrophila</i> Stamm 627	50
3.3.5.1.	Die Vergärung von Glucose durch <i>Kluyvera citrophila</i> Stamm 627	50
3.3.5.2.	Der Abbauweg der Glucose in <i>Kluyvera citrophila</i> Stamm 627	54
3.3.5.3.	Anreicherung von Zwischenprodukten des Hamameloseabbaus	58
3.3.5.4.	Isolierung und Identifizierung von Zwischenprodukten des Hamameloseabbaus	59
3.3.5.5.	Strukturaufklärung der Zuckermorphosphate	60
3.3.5.5.1.	Fructose-Phosphat und Glucose-Phosphat	60
3.3.5.5.2.	Mannit-Phosphat	62
3.3.5.5.3.	Mannose-Phosphat	64
3.3.5.5.4.	Hamamelose-Phosphat	64
3.3.5.6.	Markierungskinetik der Zwischenprodukte des anaeroben Hamameloseabbaus	67
3.3.6.	Die Umwandlung von Hamamelose-2 ¹ -Phosphat in Fructose-1-Phosphat	72
3.3.6.1.	Versuche mit positionsmarkierter Hamamelose	75
3.3.6.2.	Versuche zur Umlagerung des Hamamelosemonophosphates im zellfreien System und im Rohextrakt	76
4.	Diskussion	80
4.1.	Die Reduktion von Hamamelose zu Hamamelit in <i>Primula clusiana</i>	80
4.2.	Die Oxidation der Hamamelose zu Hamamelonsäure durch <i>Pseudomonas</i> H 1	83
4.3.	Der Abbau der Hamamelose durch <i>Kluyvera citrophila</i> Stamm 627	84
4.3.1.	Der Weg des Kohlenstoffs	84

4.3.2.	Energetische Betrachtungen	86
4.3.3.	Über den Umlagerungsmechanismus von Hamamelose- Phosphat zu Fructose-Phosphat	87
5.	Zusammenfassung	90
6.	Literaturverzeichnis	93

Abkürzungen

Ham	Hamamelose
Fru	Fructose
Glu	Glucose
Mann	Mannose
-P	-Phosphat
-DP	-Diphosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	reduzierte Form
NADP ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	reduzierte Form
FMN	Flavinmononucleotid
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CoA	Coenzym A
EDTA	Äthylendiamin-tetraessigsäure

1. Einleitung

Monosaccharide sind als Energiequellen und Bauelemente in lebenden Organismen ubiquitär verbreitet. Sie besitzen in der Regel ein unverzweigtes Kohlenstoffgerüst, wie z. B. Glucose, Mannose und Ribose. Daneben sind auch einige Monosaccharide mit verzweigter Kohlenstoffkette bekannt geworden. Diese sind meist Bestandteile größerer Moleküle. So ist die Streptose ein Bestandteil des Streptomycins (25) und Apiose eine Zuckerkomponente des Apiins (8) und eines Pektins (4).

Hamamelose (2-C-(hydroxymethyl)-D-Ribose) wurde erstmals aus Hamamelitannin, einem Gerbstoff aus der Rinde von *Hamamelis virginiana*, gewonnen (20). Doch gelang es van Scherpenberg et al. (31), auch freie Hamamelose in einer größeren Zahl von Angiospermen nachzuweisen. Weitergehende chemosystematische Untersuchungen durch Sellmair (34) lassen vermuten, daß dieser verzweigtkettige Zucker in allen höheren Pflanzen vorkommt. In den meisten der 560 bisher untersuchten Arten ist jedoch der Pool dieser Hexose so klein, daß ein sicherer Nachweis nur mit der Isotopenmethode gelingt. Die Primulaceen, und hier wiederum besonders die Vertreter der Sektion *Auriculastrum*, fielen dagegen durch hohe Konzentrationen an freier Hamamelose auf. So besteht z. B. in den Blättern von *Primula clusiana* TAUSCH der Anteil der reduzierenden Zucker überwiegend aus Hamamelose.

Daher wählte Beck (5) diese Primel als Objekt für die Untersuchung

der Biosynthese von Hamamelose. Durch die Arbeiten von Beck et al. (6), Eickenbusch et al. (14) und Gilck (19) hat man nun schon konkrete Vorstellungen vom Biosyntheseweg dieses Zuckers gewonnen.

Das Verhalten von Hamamelose und Hamamelit bei Pulsmarkierung mit Radiokohlenstoff ist gleich dem typischer sekundärer Pflanzenstoffe. So entfallen in Blättern von *Primula clusiana*, die 7 Tage lang $^{14}\text{CO}_2$ fixiert hatten, nach 7 Monaten unter $^{12}\text{CO}_2$ fast 90 % der Radioaktivität des Äthanol-Wasser-Extraktes auf Hamamelose und Hamamelit (36). Dies ist zwar nur ein indirekter Beweis dafür, daß Hamamelose stoffwechselphysiologisch sehr inert ist. Einen unmittelbaren Hinweis auf das Fehlen eines Katabolismus' dieser verzweigtkettigen Hexose erhielt man jedoch durch Fütterung der radioaktiven Substanz:

Sellmair applizierte ein Gemisch aus ^{14}C -Hamamelose und ^{14}C -Hamamelit an Blätter von *Primula clusiana*, *Rosa fendleri* und *Ribes aurea*. Er konnte weder radioaktives CO_2 noch irgendwelche andere radioaktiven Abbauprodukte erhalten. Bei diesen Versuchen wurde allerdings keine Bilanz erstellt, die über die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen gefundenen Substanzen Auskunft gibt.

Es ist sehr merkwürdig, daß Hamamelose, obwohl sie offensichtlich zu den allgemein verbreiteten Zuckern gehört, im pflanzlichen Stoffwechsel nicht wieder abgebaut werden kann. Selbst bei solchen Pflanzen, die sie in erheblichen Mengen produzieren, konnte bisher als einzige Reaktion dieses Zuckers die Reduktion zum Zuckeralkohol Hamamelit (35) nachgewiesen werden (36). Aber auch Hamamelit läßt außer einer äußerst langsam verlaufenden Reaktion mit Galactose zu 1-0- α -D-Galactopyranosyl-Hamamelit "Clusianose" (7) keinen Umsatz erkennen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Metabolismus von Hamamelose zu untersuchen, also Umwandlungsprodukte der Hamamelose zu isolieren und zu identifizieren. Die chemische Natur dieser Substanzen sollte dann Rückschlüsse gestatten auf metabolische Reaktionen,

denen Hamamelose unterliegt.

Zunächst wurden die Fütterungsversuche mit ^{14}C -Hamamelose wiederholt. Dazu wurde eine neue Fütterungsmethode entwickelt, die es gestattet, eine genaue Bilanz der wiedergefundenen Radioaktivität zu erstellen, und die außerdem erlaubte, den Stoffwechsel der ober- und unterirdischen Teile der Pflanze getrennt zu untersuchen. Für einen Metaboliten ist ja nicht unbedingt der Ort der Synthese auch der Ort des Abbaus. Es wäre denkbar, daß Hamamelose bzw. Hamamelit aus den Blättern abgeleitet und in anderen Organen - z. B. in den nichtgrünen Teilen - katabolischen Reaktionen zugänglich ist.

In seinen Untersuchungen befaßte sich Sellmair eingehender mit der Kinetik der Hamamelose-Reduktion in *Primula clusiana*. Dazu war ^{14}C -Hamamelose über eine Glaskanüle an ein Primelblatt gefüttert, von diesem nacheinander Stücke abgeschnitten und darin das Verhältnis von Hamamelose zu Hamamelit bestimmt worden. Die erste Entnahme war nach 16 Tagen erfolgt. Bis dahin waren aber bereits 82,7 % der gefütterten Hamamelose zu Hamamelit reduziert (nach 26 Tagen waren es 91,6 % und nach 62 Tagen 95,2 %). Aus diesen Daten ist die Geschwindigkeit der Hamamelosereduktion nur grob abzuschätzen. Daher wurden auch diese Untersuchungen mit einer anderen Methode und mit kürzeren Fütterungszeiten wiederholt.

Das besondere Interesse der vorliegenden Arbeit galt weiterhin der Frage, wie in der Natur die Verzweigung einer Kohlenstoffkette, wie sie die Hamamelose aufweist, abgebaut wird.

Es gibt zwar viele Reaktionen in der Biochemie, in denen Bindungen an tertiären Kohlenstoffen gelöst werden. Es handelt sich dabei jedoch vornehmlich um Verzweigungen an einem aromatischen System, oder im Fall der aliphatischen Moleküle um Methylverzweigungen (verzweigtkettige Fettsäuren) und Carboxylverzweigungen (Citrat). Diese Verzweigungen werden gemäß ihrer chemischen Natur in verschiedener Weise angegriffen, z. B. durch Spaltung - eine rückläufige Aldolkondensation - von β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA

oder durch Decarboxylierung einer β -Ketosäure. Läßt sich nun der Abbau der Verzweigung im Hamamelosemolekül auf derartige, bereits bekannte Mechanismen zurückführen, oder müssen dazu neue Vorstellungen entwickelt werden?

Sollte in den Pflanzen, die reichlich Hamamelose produzieren, kein Umsatz dieser Hexose nachweisbar sein und dieser Zucker während der Lebensdauer eines Organs nur laufend produziert und angehäuft werden, so ist anzunehmen, daß Mikroorganismen nach dem Absterben dieser Organe für die Dissimilation sorgen.

Es sollte deshalb nach Mikroorganismen gesucht werden, die Hamamelose für ihre Lebensprozesse nutzen können, und mit diesen Organismen der Metabolismus des Kohlenstoffskeletts von Hamamelose studiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

Das Pflanzenmaterial, das zur Darstellung ^{14}C -markierter Verbindungen oder zu Fütterungsversuchen verwendet wurde, stammte aus dem Staudensichtungsgarten Weißenstephan oder aus dem Botanischen Garten Nymphenburg. Im Fall von *Primula clusiana* wurden Exemplare verwendet, die gerade Fruchtsatz zeigten. Bei Versuchen mit einzelnen Blättern wurden nur diejenigen aus der Rosette genommen, die sich eben entrollt hatten.

2.2. Extraktion

Zur Extraktion wurden die Pflanzen oder die Pflanzenteile zerkleinert, anschließend zweimal mit 70%igem Äthanol, dann zweimal mit Wasser ausgekocht (alkoholischer Extrakt). Der nicht extrahierbare Rest wurde - wenn er noch weiter untersucht werden sollte - mit 1 N HCl bei 100°C drei Stunden im Einschlußröhrchen hydrolysiert (Hydrolysat) und dann das Unlösliche nach der Methode von Kalberer und Rutschmann (23) verbrannt.

Bakterien wurden mit 5%iger Perchlorsäure oder 70%igem Äthanol abgetötet und extrahiert. Die Bakterienreste wurden dann noch mit Wasser nachgewaschen, ehe sie in Solueen G 100 zur Bestimmung der aus den Bakterien nicht extrahierbaren Radioaktivität gelöst wurden.

2.3. Trennverfahren

2.3.1. Papierchromatographie

Chromatographiert wurde absteigend auf Whatmanpapier Nr. 1 bei 25° C. Waren größere Substanzmengen zu trennen, wurde Whatman Nr. 3 verwendet.

Wir benützten folgende Fließmittelgemische:

- 1: n-Butanol-Wasser(Lösung 1):Propionsäure-Wasser(Lösung 2) = 1:1
Lösung 1: n-Butanol:Wasser = 750:50 (v/v)
Lösung 2: Propionsäure:Wasser = 352:448 (v/v)
- 2: 88 % (w/w) Phenol:Wasser:Eisessig:1 M Na₂EDTA =
480:160:10:1 (v/v)
- 3: n-Butanol:Pyridin:Wasser:Eisessig = 60:40:30:3 (v/v)

Für die zweidimensionale Chromatographie kombinierten wir diese Fließmittelgemische zu folgenden Systemen:

- System I: 1 + 2
System II: 1 + 3
System III: 2 + 3

2.3.2. Hochspannungselektrophorese

Um aus Reaktionsgemischen Salze zu entfernen oder nicht flüchtige geladene Substanzen von ungeladenen zu trennen bzw. als geladen zu charakterisieren, unterwarfen wir die Proben der Hochspannungselektrophorese unter folgenden Bedingungen:

- 1: Triäthylaminacetat-Puffer (29)
0,1 M; pH 9,7; 55 V/cm; 8° C; 60 min
- 2: Ammoniumformiat-Puffer (22)
0,2 M; pH 3,7; 27 V/cm; 8° C; 90 min

Zucker und Zuckeralkohole ließen sich in einem komplexierenden Puffersystem trennen bzw. durch ihre Laufstrecke charakterisieren.

3: Natriumborat-Puffer (17)

0,05 M; pH 9,2; 55 V/cm; 8⁰ C; 90 min

Die Substanzen wurden zur Papierelektrophorese mit wenig Puffer aufgenommen und dann punkt- oder strichförmig auf das mit Puffer befeuchtete Papier aufgetragen. Die Elektrophoresen wurden auf Whatmanpapier Nr. 1, bei größeren Substanzmengen auf Whatman Nr. 3, durchgeführt.

Tabelle 1 gibt die R-Pikrinsäure-Werte von Zuckern und Zuckeralkoholen bei Elektrophorese in Na-Borat-Puffer wieder.

2.3.3. Säulenchromatographie flüchtiger organischer Säuren

Die bei der Gärung anfallenden flüchtigen Säuren wurden auf einer Kieselgelsäule im Prinzip nach Varner (42) getrennt.

12 g gewaschenes, wasserfreies Kieselgel (Mallinckrodt p. a.; 100 mesh) wurden mit 7,2 ml 0,0025%iger Methylorange-Lösung versetzt (30) und innig vermischt. Das hellorange Pulver wurde in ca. 80 ml wassergesättigtem Chloroform aufgeschlämmt und in eine Säule (Durchmesser 1 cm, Länge 20 cm) gegossen.

Die Säuren wurden durch Perkolation mit Äther aus dem Gärungsgemisch extrahiert, neutralisiert und unter Vakuum gefriertrocknet, sodann in ca. 0,2 ml Wasser aufgenommen und mit 1 mmol Ameisensäure, Essigsäure und Milchsäure, 0,5 mmol Propionsäure und 0,1 mmol Na-Pyruvat versetzt. Nach Zugabe eines Tropfens Perchlorsäure wurde dieses Gemisch in 0,3 g trockenes Kieselgel eingerührt und die krümelnde Masse auf die Säule eingebracht.

Entwickelt wurde die Säule mit einem Gradienten aus wassergesättigtem Chloroform und Butanol (Stufen zu 5 % von 0 - 20 % Butanol). Die Säuren wanderten auf der gelbgefärbten Säule als rote Banden. Es wurden Fraktionen von jeweils 3 ml aufgefangen. Davon wurde 1 ml zur Bestimmung der Radioaktivität entnommen, der Rest mit 0,1 N NaOH titriert. Ein typisches Elutionsdiagramm zeigt Abb. 1.

Tab. 1: R-pikrinsäure-Werte von Zuckern und Zuckeralkoholen bei
Elektrophorese in Na-Borat-Puffer

Glucose	0,81	Xylit	0,94
Galactose	1,18	Altrit	1,13
Mannose	0,85	Mannit	1,14
Fructose	1,06	Sorbit	1,05
Hamamelose	0,84	Dulcit	1,25
Sedoheptulose	0,76	Hamamelit	1,05
Adonit	0,65	Volomit	1,12

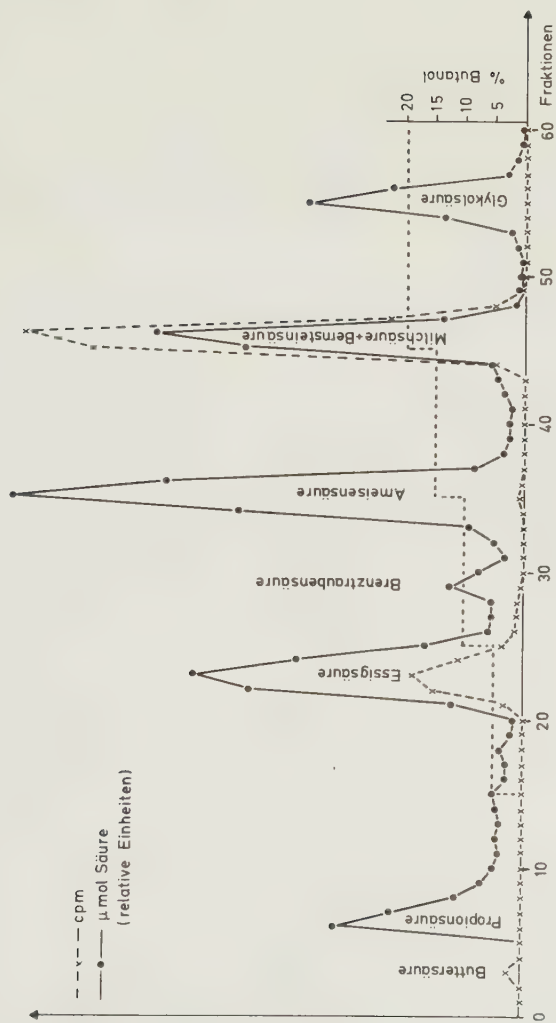


Abb. 1

Chromatographische Trennung von organischen Säuren an einer Kieselgelsäule

—•— durch Titration bestimmte Säuremenge - - - - - x Radioaktivität der einzelnen Fraktionen

2.3.4. Gaschromatographie

Zur näheren Charakterisierung von Substanzen bestimmten wir die Retentionszeiten (min) der Trimethylsilyl-Derivate bei der Gaschromatographie.

Gerät: Packard, Modell 7461/564

Säulenfüllung: 4 % GE SE 54 auf Gaschrom Q (60-80 mesh)

Säulenlänge: 6 ft

Temperaturprogramm: Start bei 120° C (10 min) anschließend eine Temperatursteigerung von 3° C/min auf 210° C

Carriergas: Stickstoff

Die Verbindungen wurden mit N-methyl-N-trimethyl-silyl-trifluoracetamid gelöst und trimethylsilyliert.

2.4. Lokalisation von Substanzen auf den Papierchromatogrammen und Papierpherogrammen

Radioaktive Substanzen auf den Chromatogrammen und Pherogrammen wurden durch Radioautographie auf Agfa-Röntgenpapier oder bei sehr geringen Aktivitäten auf Agfa-Röntgenfilm Curix RP lokalisiert.

Zucker und Substanzen mit vicinalen Hydroxylgruppen wurden durch Besprühen mit alkalischem Silbernitrat (41) bzw. mit Benzidin-Perjodat (13) angefärbt.

Organische Säuren wurden durch Besprühen mit Anilin-Glucose mit anschließendem Erhitzen auf 125° C für 5 - 10 min sichtbar gemacht.

2.5. Messung der Radioaktivität

2.5.1. Messung gelöster radioaktiver Substanzen

Die Messung gelöster radioaktiver Substanzen erfolgte im Scintillationszähler (Beckman LS 250).

Wässrige, nicht salzhaltige Lösungen wurden in einem Dioxan-Cocktail folgender Zusammensetzung gezählt:

5 g PPO (=2,5-Diphenyloxazol); 100 g Naphthalin in 1 l Dioxan

Die Messung von Methanol-Äthanolamingemischen und der in Solueen G 100 gelösten Substanzen erfolgte in einem Toluol-Cocktail:

5 g PPO in 1 l Toluol

Wässrige, salzhaltige Lösungen wurden im gleichen Cocktail durch den Lösungsvermittler BBS 3 in Lösung gebracht.

Bei allen Scintillationsmessungen wurden die gemessenen Daten (cpm) durch die Methode der inneren Standardisierung auf die Realzerfälle (dpm) umgerechnet.

2.5.2. Messung radioaktiver Substanzen auf Papierchromatogrammen und Papierpherogrammen

Zur Messung radioaktiver Substanzen auf Chromatogrammen und Pherogrammen wurden die auf dem Radioautogramm auftretenden Flecken mit einem großflächigen Methandurchflußzählrohr mit Endfenster ausgezählt. War die Radioaktivität zu gering für eine hinreichend genaue Messung, wurden die Flecken ausgeschnitten und im Toluol-Cocktail im Scintillationszähler gemessen.

2.5.3. Messung von $^{14}\text{CO}_2$

Bei Gärungs- und Fütterungsversuchen wurde das eventuell entstehende CO_2 in Kalilauge absorbiert. Laugen erzeugen in Verbindung mit den Zählflüssigkeiten für Scintillationszähler Chemosolumineszenz und täuschen so unter Umständen Radioaktivität vor. Aus diesem Grund wurde das in KOH absorbierte CO_2 in einer bei Gibbs et al. (18) beschriebenen Apparatur mit Phosphorsäure in Äthanolamin übergetrieben. Die Absorption des CO_2 durch Äthanolamin war nach 1 Std. Schütteln vollständig: Wie Testversuche ergaben, erfolgt dabei das Austreiben und die Reabsorption von CO_2 ohne Verlust. Bei 6 Proben wurde ein Mittelwert von 100,0 % mit einer Standardabweichung von $\pm 2,5$ % gefunden.

Das Äthanolamin (2 ml) wurde nach dem Übertreiben mit 13 ml Methanol versetzt. 10 ml dieses Gemisches wurden dann mit 10 ml Toluol-Cocktail im Scintillationszähler gemessen.

2.6. Darstellung von ^{14}C -uniform markierter Hamamelose

Zur Gewinnung von Hamamelose- $\text{U-}^{14}\text{C}$ wurden junge Blätter von *Primula clusiana* in der von van Scherpenberg (31) beschriebenen Apparatur während 30 min in $^{14}\text{CO}_2$ -haltiger Luft belichtet. Nach der Extraktion isolierten wir die radioaktive Hamamelose durch aufeinanderfolgende Chromatographie in den Fließmittelmischungen 1, 2 und 3. Hamamelit verhält sich bei der Chromatographie ähnlich wie Hamamelose. Die beiden Substanzen mußten daher als Borat-Komplexe mittels Papierelektrophorese getrennt werden. Der Hamamelose-Borat-Komplex wurde anschließend durch Zugabe von Ameisensäure (0,2 ml pro 10 ml Lösung) zerstört, die Natriumionen durch Behandlung mit 0,5 ml feuchtem Kationenaustauscher (Dowex 50 W X 8; 100 mesh; H^+ -Form) und die Borsäure durch fünfmaliges Abdampfen am Rotationsverdampfer mit Methanol entfernt.

2.7. Darstellung von positionsmarkierter Hamamelose

Beck et al. (6) konnten zeigen, daß Hamamelose in den Blättern von *Primula clusiana* aus exogener Glucose gebildet wird. Durch Fütterung positionsmarkierter Glucosen wiesen diese Autoren eine biogenetische Beziehung zwischen den einzelnen Kohlenstoffatomen der Glucose und der Hamamelose nach. Demnach ergibt sich aus der Position C_1 der Glucose ein Einbau von ^{14}C in die C_{21} -Stellung der Hamamelose und aus C_6 in C_5 .

Primula clusiana nimmt die zur Gewinnung der positionsmarkierten Hamamelose gefütterten positionsmarkierten Glucosen, bedingt durch ihren xeromorphen Bau, nur langsam auf. Daher müssen längere Fütterungszeiten in Kauf genommen werden, was wiederum eine gewisse Verschmierung der Radioaktivität in der Hamamelose un-

vermeidlich macht.

An je 2 Blätter von *Primula clusiana* wurden nun unter 18-stündiger Belichtung mit 20000 Lux Glucose-1- ^{14}C bzw. Glucose-6- ^{14}C appliziert. Die dabei entstehenden positionsmarkierten Hamamelosen wurden aus den Blattextrakten durch Chromatographie und Boratelektrophorese gewonnen.

Durch Mischung der beiden positionsmarkierten Hamamelosen sollte dann eine Hamamelose mit zwei Schwerpunkten der Markierung dargestellt werden, wobei sich der eine Schwerpunkt (C_2) durch etwa die doppelte Radioaktivität des anderen (C_5) zu erkennen gibt.

In einem aliquoten Teil dieser Hamamelose wurde zunächst durch Perjodat-Oxidation die genaue Markierung der $^{14}\text{C}_2$ - $^{14}\text{C}_5$ -Hamamelose untersucht. Die Positionen C_2 und C_5 sind aber durch die von Gilck (19) für Hamamelose ausgearbeitete Methode nicht zu trennen; denn beide Kohlenstoffatome werden als Formaldehyd abgespalten und damit gemeinsam erfaßt.

Um nun die Abspaltung eines dieser C-Atome bei der Perjodat-Oxidation zu blockieren, wurde die Hamamelose durch die im Rohextrakt aus *K. citrophila* 627 enthaltene Hamamelosekinase phosphoryliert und das Hamamelose-P zu Hamamelit-P reduziert. Dieses wurde der Perjodat-Oxidation unterworfen, und die Spaltstücke mit Hilfe der Isotopenverdünnungsmethode untersucht (Abb. 2).

Die Radioaktivität verteilt sich demnach folgendermaßen auf die einzelnen Positionen des Hamamelosemoleküls:

$\text{C}_1 + \text{C}_5$	(Formaldehyd)	32,9 %
$\text{C}_3 + \text{C}_4$	(Ameisensäure)	12,8 %
$\text{C}_2 + \text{C}_2$	(aus der Differenz)	54,2 %

Nimmt man an, daß in die Positionen C_1 und C_2 die gleiche Radioaktivität durch Verschmierung gelangte wie in die Positionen 3

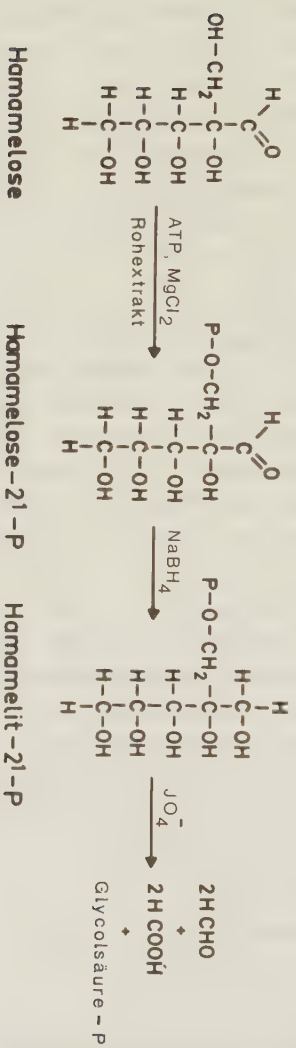


Abb. 2

Chemischer Abbau von Hamamelose über Hamamelose-P

und 4, so wären in der Position C₂ 1 47,8 %, in der Position C₅ 26,5 % und in den Positionen C₁, C₂, C₃ und C₄ jeweils 6,4 % der Radioaktivität des Moleküls zu finden.

2.8. Darstellung von nicht radioaktiver, kristalliner Hamamelose

Die für die Isolierung und Anzucht der Bakterien benötigte nicht radioaktive Hamamelose wurde aus Hamamelisrinde dargestellt. Die Gewinnung von Hamamelitannin und dessen Hydrolyse erfolgte nach der Methode von Beck et al. (6).

Das Hydrolysat wurde einige Tage bei 2⁰ C aufbewahrt und die ausfallende Gallussäure abgenutscht. Das Filtrat wurde nach Neutralisation mit festem NaCO₃ bis zur sirupösen Konsistenz am Rotationsverdampfer eingeengt und nach Zugabe von ca. 100 ml Butanol zur Trockne gebracht. Der nun wasserfreie Rückstand wurde zur Abtrennung des Salzes mit Methanol versetzt, kurz unter Rückfluß zum Sieden erhitzt und nach dem Abkühlen abfiltriert. Das Filtrat ergab nach dem Einengen und Trocknen im Vakuum einen zähflüssigen Sirup von ca. 20 g.

6 - 8 g dieses Sirups wurden auf eine Celit-Säule (Durchmesser 6 cm, Länge 70 - 80 cm) nach Lemieux (26) aufgetragen. Dann wurde mit wassergesättigtem Butanol unter positivem Druck entwickelt, wobei eine Laufgeschwindigkeit von 2 - 3 l pro 24 Std. eingestellt wurde. Aliquote Teile des Eluats wurden papierchromatographisch im Laufmittel 3 auf Hamamelosegehalt geprüft. Die reine Hamamelose enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, am Rotationsverdampfer bei 50⁰ C eingeengt und der nun wasserfreie zähe Sirup in Methanol gelöst. Nach dem Entfärben mit wenig Aktivkohle kann Hamamelose aus Methanol/Petroläther kristallisiert werden (19).

2.9. Applikation radioaktiver Zucker an ganze Pflanzen

Um nach Applikation radioaktiver Zucker den Stoffwechsel der ober- und unterirdischen Pflanzenteile getrennt untersuchen zu können, wurde ein Fütterungsglas mit zwei voneinander abge-

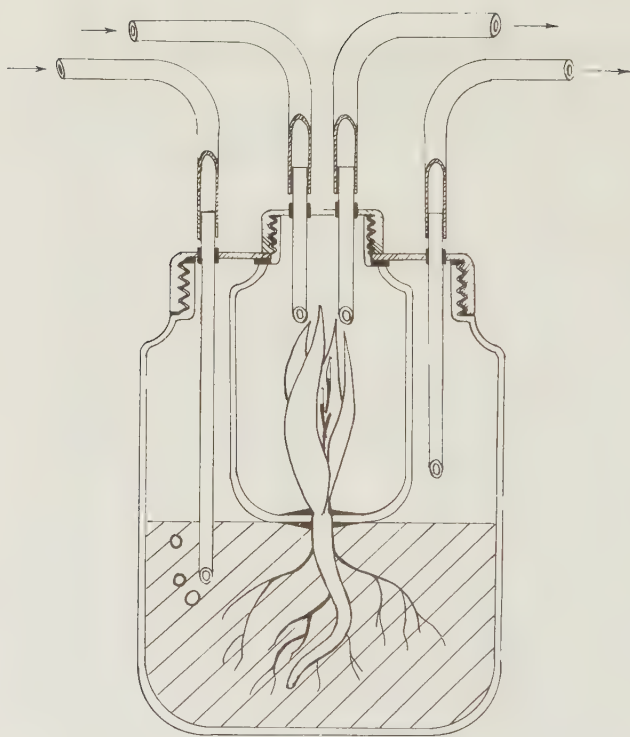


Abb. 3

Apparatur zur Applikation radioaktiver Zucker an *Pr. clusiana*

geschlossenen Lufträumen konstruiert (Abb. 3). Die oberirdischen Teile einer Pflanze nahm dabei ein Gläschen mit Schraubverschluß auf, dessen Boden eine Öffnung hatte. Durch diese ragten die unterirdischen Teile der Pflanze, wobei die Durchtrittsstelle mit Gummi und Wachs abgedichtet wurde. Dieses Fütterungsgläschen wurde in den Deckel eines Standglases mit Wasser (Leitungswasser mit 200 µg Penicillin G-Na pro ml) eingeschraubt, und zwar so, daß die unterirdischen Teile gerade ins Wasser ragten. Oberirdische und unterirdische Teile der zu untersuchenden Pflanze waren somit von zwei abgeschlossenen Räumen umgeben, die getrennt voneinander mit Luft durchströmt werden konnten. Mit Hilfe dieser Apparatur konnte man nun das CO_2 aus dem Wurzelbereich - unter Umständen Exkrete der Wurzeln, die dann von der Mikroflora abgebaut wurden - und das von den Blättern ausgeschiedene CO_2 getrennt in Kalilauge absorbieren.

Die radioaktiven Lösungen, die appliziert werden sollten, wurden in Glasröhrchen aufgesogen (Durchmesser 1 mm, Länge 1 cm), die sich zu einer feinen Kanüle verjüngten. Diese Kanüle wurde in den Blattstiel gestochen und die zu applizierenden Lösungen konnten so von den Pflanzen aufgenommen werden.

2.10. Inkubation von Pseudomonas H1 mit radioaktiver Hamamelose unter Sauerstoff

Bakterien einer 22 Std. alten Kultur (500 ml Nährlösung II) wurden geerntet, zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mit 3 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 6,4) in den Hauptraum eines Warburg-Gefäßes gebracht. Im Mitteleinsatz des Gefäßes befand sich 3 N KOH zur Absorption von CO_2 .

Um die Organismen an Reservestoffen zu verarmen, wurde die Suspension zunächst ohne Hamamelose solange bei 30° C geschüttelt, bis ein merklicher Abfall des Sauerstoffverbrauchs eintrat. Dann wurde das Gefäß mit Sauerstoff gespült und 0,06 mmol ^{14}C -Hamamelose (0,21 µCi) in den Hauptraum gekippt.

2.11. Durchführung der Puffervergärung von Hamamelose mit

Kluyvera citrophila Stamm 627

Wegen der besseren Nutzung der gefütterten Hamamelose wurden die Bakterien unter Luft angezogen (bei 30° C auf dem Schüttelbrett).

Für einen Gäransatz wurden die Zellen aus 0,5 l einer 15 Std. alten dichtbewachsenen Kultur mittels Zentrifugation (5000 g, 20 min) geerntet, zweimal mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,4 gewaschen und dann in 10 ml dieses Puffers aufgenommen. 2,5 ml dieser Suspension wurden zusammen mit der gleichen Menge Puffer in den Hauptraum eines Warburg-Gefäßes gebracht. Im Mitteleinsatz befand sich 3 N Kalilauge zur Absorption von CO₂. In den Seitenarm wurde die radioaktive Zuckerlösung pipettiert. Nach dem Durchspülen des Gefäßes mit Stickstoff und nach dem Temperatenausgleich wurde die radioaktive Zuckerlösung zugekippt. Vergoren wurde bei 30° C. Die Vergärung wurde durch Zugabe von 0,5 ml 70%iger Perchlorsäure oder durch Eingießen des Gärgemisches in kochendes 96%iges Äthanol abgebrochen.

Die Bakterienreste wurden dann abzentrifugiert (2000 g, 10 min) und einmal mit Wasser gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Überstände vereinigt und auf ein Volumen von 10 ml gebracht. Das Zentrifugat wurde in Solueen G 100 gelöst und nach Zugabe von 10 ml Toluol-Cocktail im Scintillationszähler gezählt (in den Bakterien festgelegte Radioaktivität).

2.12. Applikation von ¹⁴C-Hamamelose an Kluyvera citrophila 627.

Erstellung einer Markierungskinetik von Zwischenprodukten

Bakterien aus 1 l einer 15 Std. alten Kultur wurden geerntet und zweimal mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,4 gewaschen, dann in 10 ml dieses Puffers aufgenommen und in ein mit Stickstoff gefülltes Becherglas gebracht. Gearbeitet wurde bei Zimmertemperatur. Nach 5 min wurden 5 µCi ¹⁴C-Hamamelose zugegeben, dann in den in Tab. 16 angegebenen Zeitabständen jeweils 1 ml der Bakteriensuspension entnommen und sofort in kochendem

70%igem Äthanol abgetötet. Nach Extraktion und Zentrifugation wurde ein aliquoter Teil des Überstandes entnommen und darin die prozentualen Anteile der flüchtigen Verbindungen bestimmt. Dazu wurde die Probe nach Messung der Radioaktivität dreimal am Rotationsverdampfer in saurem Milieu (pH 3) zur Trockne gebracht, wobei dazwischen mit Wasser aufgenommen worden war. Nach dieser Behandlung wurde die noch verbliebene Radioaktivität bestimmt. Die Differenz gibt die prozentualen Anteile der flüchtigen Abbauprodukte an der eingesetzten Radioaktivität wieder. Der restliche Überstand wurde dann zur Trockne gebracht und auf die Zusammensetzung aus nicht flüchtigen Substanzen hin untersucht.

2.13. Rohextraktpräparation aus *Kluyvera citrophila* Stamm 627

Zur Präparation eines Proteinrohextraktes aus *K. citrophila* 627 wurden 0,5 l einer 15 Std. alten Zellkultur abzentrifugiert, die Bakterien zweimal mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,4 gewaschen und dann in 10 ml des gleichen Puffers aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen durch Ultraschall aufgebrochen und die unlöslichen Rückstände bei 16000 g 20 min abzentrifugiert. Es verblieben 8 ml Proteinrohextrakt.

2.14. Perjodat-Oxidation

2.14.1. Perjodat-Oxidation von Zuckeralkoholphosphaten und Isolierung der Spaltprodukte

Eine wässrige Lösung der zu spaltenden Substanzen (0,5 - 1 ml) wurde mit dem gleichen Volumen 0,2 M Na-Perjodatlösung versetzt und 30 min bei Zimmertemperatur im Dunkeln aufbewahrt. Nach dem Ansäuern mit 5 N Schwefelsäure wurde dann überschüssiges Perjodat und Jodat durch Titration mit 1 M Na-Arsenitlösung (bis zum Verschwinden der Jodfärbung) entfernt (11).

Dann wurden jeweils 1 ml einer geeichten Formaldehyd- und Ameisensäurelösung zugegeben. Die Isolierung des Formaldehyds und

der Ameisensäure aus dem Reaktionsgemisch erfolgte nach der Vorschrift von Gilck (19).

Mit Hilfe der Isotopenverdünnungsmethode konnte nun nach der Perjodat-Oxidation das Molverhältnis von Spaltprodukt zu Ausgangssubstanz ermittelt werden.

2.14.2. Perjodat-Oxidation von ^{14}C -Mannit

^{14}C -Mannit aus Mannit-P wurde mit nicht radioaktivem Mannit bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität umkristallisiert.

Eine Lösung von 0,1 mmol Mannit in 5 ml Wasser wurde zur Perjodat-Spaltung mit dem gleichen Volumen einer 0,2 M Na-Perjodatlösung versetzt und 5 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Überschüssiges Perjodat und Jodat wurden wie unter 2.14.1. beschrieben entfernt.

Die Isolierung der Spaltprodukte erfolgte wiederum nach der Methode von Gilck (19).

2.15. Nährmedien

Zur Isolierung und Anzucht der Bakterien wurden flüssige Nährmedien folgender Zusammensetzung (jeweils pro 1 dest. Wasser) verwendet:

Nährmedium I:

0,1	g	KH_2PO_4
0,1	g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
0,1	g	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
0,4	g	KNO_3
0,3	g	KCl
1,4	mg	FeCl_3
5	ml	gesättigte EDTA-Lösung
1	ml	Hoaglands AZ-Lösung

Nährmedium II (10):

5	g	Na_2HPO_4
5	g	NaCl
1	g	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
2	g	Na-Citrat
0,05	g	Pepton

Nährmedium III:

2	g	K_2HPO_4
2	g	KH_2PO_4
1	g	NaCl
1	g	NH_4Cl
0,02	g	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} *$
0,02	g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} *$
1,4	mg	FeCl_3
1	ml	Hoaglands AZ-Lösung

* Diese Salzlösungen wurden zur Vermeidung einer Niederschlagsbildung jeweils getrennt autoklaviert und erst nach Abkühlung der Lösung der übrigen Salze zugesetzt

Wegen der Labilität der Hamamelose ist deren kalte Sterilisation angebracht. Dazu wurde eine 25%ige Hamameloselösung durch ein bakteriendichtes Filter gedrückt. Von dieser sterilen Lösung wurde dann der autoklavierten Salzlösung die entsprechende Menge zugesetzt (Hamamelosekonzentration meist 0,3 %).

Bei allen Nährlösungen ergab sich ein pH-Wert von 6,4.

Nährmedium IV:

20	g	CaCO_3
10	g	Hefe-Extrakt
20	g	Glucose

3. Ergebnisse

3.1. Der Umsatz von Hamamelose in höheren Pflanzen

3.1.1. Vorversuche

Um einen Umsatz von Hamamelose in einer höheren Pflanze erfassen zu können, sollte eine genaue Bilanz der Radioaktivität nach Applikation von ^{14}C -Hamamelose an eine Versuchspflanze erstellt werden. Damit die Applikation der Hamamelose unter optimalen Bedingungen erfolgt, wurde in Vorversuchen geprüft, ob nicht Dauerdunkel als eine physiologische Extremsituation den Umsatz von Hamamelose stimuliert. Weiterhin sollten verschiedene Pflanzen auf einen Metabolismus von Hamamelose geprüft werden. Sie wurden für die Vorversuche nach folgenden Gesichtspunkten ausgewählt:

- a) Eine Pflanze, die reichlich Hamamelose synthetisiert und diese zu Hamamelit reduziert: *Primula clusiana* TAUSCH
- b) Eine Pflanze, die reichlich Hamamelose aber keinen Hamamelit bildet: *Soldanella alpina* L.
- c) Eine Pflanze, in der Hamamelose nach 1 Std. Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$ zwar radioaktiv markiert wird, bei der allerdings dieser Zucker nicht angereichert wird (und daher mit Sprühreagenzien auf den Chromatogrammen nicht nachweisbar ist): *Rosa fendleri*

An je 2 Blätter dieser Pflanzen wurden nun über die Blattstiele

0,05 μCi Hamamelose- ^{14}C in 50 μl Wasser appliziert. Nach dem Aufsaugen dieser Lösung wurde bis zum Versuchsende Wasser nachgegeben. Ein Teil der Pflanzen war während des Versuchs dem normalen täglichen Hell-Dunkel-Wechsel unterworfen; Parallelproben von *Primula clusiana* und *Rosa fendleri* wurden im Dauerdunkel gehalten. Nach 4 Tagen wurden die Blätter abgetötet und die Äthanol-Wasser-Extrakte mittels Chromatographie und Elektrophorese untersucht. In *Soldanella alpina* und *Rosa fendleri* wurde nur radioaktive Hamamelose gefunden. Bei *Primula clusiana* waren in den Blättern, die der Hell-Dunkel-Rhythmik unterworfen waren, 70,5 % Hamamelose und 29,5 % Hamamelit enthalten. Bei den Blättern, die im Dauerdunkel gehalten worden waren, betrug das Verhältnis 85,3 % Hamamelose zu 14,7 % Hamamelit.

Andere ^{14}C -markierte Substanzen, die auf einen weiteren Metabolismus von Hamamelose in *Primula clusiana* hingedeutet hätten, konnten nicht entdeckt werden.

3.1.2. Vergleich des Metabolismus' von ^{14}C -Hamamelose und ^{14}C -Glucose in *Primula clusiana*

Aus den Vorversuchen ging hervor, daß unter den geprüften Pflanzen lediglich in *Primula clusiana* mit einem Umsatz der Hamamelose zu rechnen ist. Daher wurde diese Pflanze für weitere Untersuchungen herangezogen. Durch eine Modifizierung der Fütterungsmethode wurde eine genaue Bilanz über die Verteilung der Radioaktivität nach Fütterung von ^{14}C -Hamamelose in die einzelnen Pflanzenorgane und Fraktionen erstellt, die Auskunft gibt, ob und in welchem Ausmaß die Hamamelose in *Primula clusiana* einer Umwandlung oder einem Transport unterliegt. Des weiteren wurde durch die Wahl kürzerer Fütterungszeiten eine genauere Kinetik der Reduktion von Hamamelose zu Hamamelit aufgenommen.

Dazu wurde an 5 Pflanzen von *Primula elusiana* ^{14}C -Hamamelose und zum Vergleich an 2 Pflanzen ^{14}C -Glucose nach der unter 2.9. beschriebenen Methode appliziert. Die radioaktiven Zucker (jeweils 1 μCi pro Pflanze) wurden durch eine feine Glas-kanüle in die Basis des eben entrollten Blattes infiltriert. Die Kanülen blieben einen Tag an der Pflanze.

3.1.2.1. Die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Pflanzenorgane, sowie auf exhalierendes CO_2 und auf Wurzel-ausscheidungen

Nach 35 Std., 3, 5, 7 und 21 Tagen wurde eine der Pflanzen zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung aufgearbeitet. Dazu wurde das Blatt, an das appliziert worden war, der Rest der Rosette und das Rhizom mit den Wurzeln einzeln extrahiert, der Rückstand hydrolysiert und schließlich das Unhydrolysierbare zu CO_2 verbrannt und die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen gemessen. Der ^{14}C -Gehalt des in der Kalilauge absorbierten, exhalierenden CO_2 wurde wie unter 2.5.3. beschrieben bestimmt. Weiterhin wurde auch die Radioaktivität im Wasser, in das die unterirdischen Teile der Versuchspflanzen eintauchten, gemessen. Die in den einzelnen Fraktionen gefundene Radioaktivität gibt Tab. 2 wieder.

Nach Fütterung von ^{14}C -Hamamelose enthalten nur die Äthanol-Wasser-Extrakte wesentliche Mengen an Radioaktivität und hier vornehmlich diejenigen des Blattes, an das appliziert worden war. Von den unterirdischen Teilen der Primeln wurden praktisch keine radioaktiven Stoffe abgegeben: Weder das Wasser selbst enthielt bemerkenswerte Mengen an ^{14}C , noch wurde durch den Luftstrom $^{14}\text{CO}_2$ aus dem Wasser ausgetrieben*.

* Die Probe 5 macht hierbei eine Ausnahme. Bei diesem Versuch drang einmal Wasser in das Fütterungsglas ein und überflutete die Einstichstelle der Fütterungskapillaren. Ein Auswaschen der ^{14}C -Hamamelose aus den Wunden muß angenommen werden.

Tab. 2: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Fraktionen nach Fütterung von ^{14}C -Hamamelose und ^{14}C -Glucose an *Primula elusiana* in Abhängigkeit von der Zeit

Gefütterter Zucker Fütterungszeit	Hamamelose				Glucose	
	35 Std	3 Tage	5 Tage	7 Tage	21 Tage	42 Std 3 Tage
Fraktionen:						
Wasser	0,3	0,5	9,7	1,4	1,1	0,5 0,9
CO_2 aus d. Pflanze	0,1	0,7	1,8	0,2	0,8	11,7 18,9
CO_2 aus d. Wasser	0,0	0,0	1,6	0,5	2,1	0,3 2,4
Äthanol-Wasser-Extrakt						
Blatt	81,1	64,6	80,5	93,9	58,8	24,7 26,6
restl. Rosette	16,8	27,8	1,8	2,1	29,9	38,0 13,0
Rhizom	1,1	5,9	3,5	0,9	3,9	3,8 1,9
Hydrolysate						
Blatt	0,5	0,4	0,7	0,9	0,4	10,0 18,3
restl. Rosette	0,0	0,1	0,0	0,0	1,1	4,4 5,0
Rhizom	0,0	0,0	0,2	0,0	0,9	0,1 0,4
Unhydrolysierbares						
Blatt	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	4,2 9,9
restl. Rosette	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	2,3 2,5
Rhizom	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,1 0,3
Ausbeute	94,8	92,0	102,4	99,8	96,1	80,9 89,6

Das CO_2 aus der Pflanze enthält selbst nach 21 Tagen nicht einmal 1 % der aufgenommenen Radioaktivität. Das CO_2 aus dem Wasser enthält zwar nach 21 Tagen mit 2,1 % erheblich mehr Radioaktivität als bei kürzeren Fütterungszeiten, doch ist auch diese Menge für einen Umsatz oder eine Ausscheidung über die Wurzeln nicht signifikant, da das Rhizom dieser Pflanze verletzt worden war. In den Hydrolysaten und im Unlöslichen der extrahierten Pflanzenteile findet sich praktisch keine Radioaktivität.

Die Streuung von $\pm 5,2$ % bei der Ausbeute an wiedergefundener Radioaktivität ist wohl auf eine Summation von Meßungenauigkeiten zurückzuführen.

Die Fütterung von ^{14}C -Glucose an die Primeln wurde als Kontrollversuch zur ^{14}C -Hamamelose-Applikation unternommen. Die Versuchsdauer betrug 42 Std. bzw. 3 Tage. Daraufhin wurden die Pflanzen genauso aufgearbeitet wie nach der Fütterung mit ^{14}C -Hamamelose.

Es zeigte sich bei diesen Versuchen, daß bereits nach 42 Std. etwa 12 % und nach 3 Tagen fast 20 % der eingesetzten Radioaktivität als $^{14}\text{CO}_2$ von den Pflanzen exhaliert wird. Auffallend ist auch, daß bei Fütterung von ^{14}C -Glucose ein großer Teil der Radioaktivität in der hydrolysierbaren und nichthydrolysierbaren Fraktion enthalten war. Bemerkenswert ist aber auch hier, daß fast keine Radioaktivität über die Wurzeln in das Wasser, in das die Wurzeln ragten, gelangte.

Die Ableitung der Radioaktivität aus dem Blatt, an das appliziert worden war, in die restliche Rosette und ins Rhizom scheint im wesentlichen von Zufälligkeiten beim Einstich der Fütterungskapillaren abzuhängen. Bei der Hamamelose-Fütterung waren nach 3 Tagen 27,8 % in die restliche Rosette abgeleitet worden, beim Versuch nach 5 Tagen waren dagegen nur 1,8 % zu finden. Ähnliche Verhältnisse ergaben sich auch bei der Glucose, wo nach 42 Std. 40 % abgeleitet waren; in der Pflanze, die nach 3 Ta-

gen untersucht wurde, erst 15 %.

3.1.2.2. Die Verteilung der Radioaktivität auf einzelne Substanzen und deren Identifizierung in den Äthanol-Wasser-Extrakten

Zur Bestimmung der Verteilung der Radioaktivität auf einzelne Substanzen und deren Identifizierung in den Äthanol-Wasser-Extrakten wurden diese chromatographisch in den Fließmittelsystemen I und II zweidimensional aufgetrennt. Tab. 3 gibt die gefundenen ^{14}C -markierten Substanzen, die auf Grund ihres Laufverhaltens bei der Chromatographie identifiziert wurden, und ihren prozentualen Anteil an der Gesamtradioaktivität wieder.

Hamamelose und Hamamelit enthalten am meisten Radiokohlenstoff. Nach 3 Tagen erscheint ^{14}C -Clusianose, die kontinuierlich bis zu einem Höchstwert von 4 % - bezogen auf den ^{14}C -Gehalt des Blattes - angereichert wird. In der restlichen Rosette, also entweder in der Plumula oder in den alten Blättern, erscheint nach 3 Tagen eine Substanz X. Unter Umständen ist sie identisch mit dem von Sellmair vermuteten Hamamelit-Glycosid. Dies konnte aber wegen der zu geringen Radioaktivität, die sie enthielt, nicht entschieden werden.

Da Hamamelose und Hamamelit bei der Chromatographie in allen verwendeten Fließmitteln nicht ausreichend voneinander zu trennen sind, wurde durch Elektrophorese in Na-Borat-Puffer bestimmt, ob und in welchem Ausmaß Hamamelit aus Hamamelose gebildet worden war. Das Ergebnis zeigt Abb. 4. Daraus geht deutlich hervor, daß Hamamelose in dem Blatt, an das appliziert worden war, sehr rasch reduziert wird. Nach einer Lag-Phase von 3 Tagen nimmt der Hamamelitanteil in der Rosette ebenfalls zu, bleibt aber dann nach 7 Tagen nahezu konstant. Das Rhizom zeigt eine noch längere Anlaufphase in der Hamamelose-Reduktion. Der Hamamelit nimmt aber dann langsam und

Tab. 3: Prozentuale Verteilung der wiedergefundenen Radioaktivität auf Hamamelose + Hamamelit, Clusianose und nicht identifizierte Substanz bezogen auf den Gesamt-¹⁴C-Gehalt der Pflanzen

Fütterungszeit	Organ	Hamamelose + Hamamelit	Clusianose	nicht identifizierte Substanz
35 Std.	Blatt	68,8	0,0	0,0
	Rosette	16,8	0,0	0,0
	Rhizom	-	-	-
3 Tage	Blatt	64,0	0,5	0,0
	Rosette	25,1	0,0	2,5
	Rhizom	0,0	0,0	0,0
5 Tage	Blatt	77,9	0,9	0,0
	Rosette	1,7	0,0	0,1
	Rhizom	1,9	0,0	0,6
7 Tage	Blatt	89,4	3,8	0,0
	Rosette	1,9	0,0	0,0
	Rhizom	-	-	-
21 Tage	Blatt	56,0	2,4	0,0
	Rosette	26,6	0,0	2,7
	Rhizom	3,9	0,0	0,0

- nicht untersucht

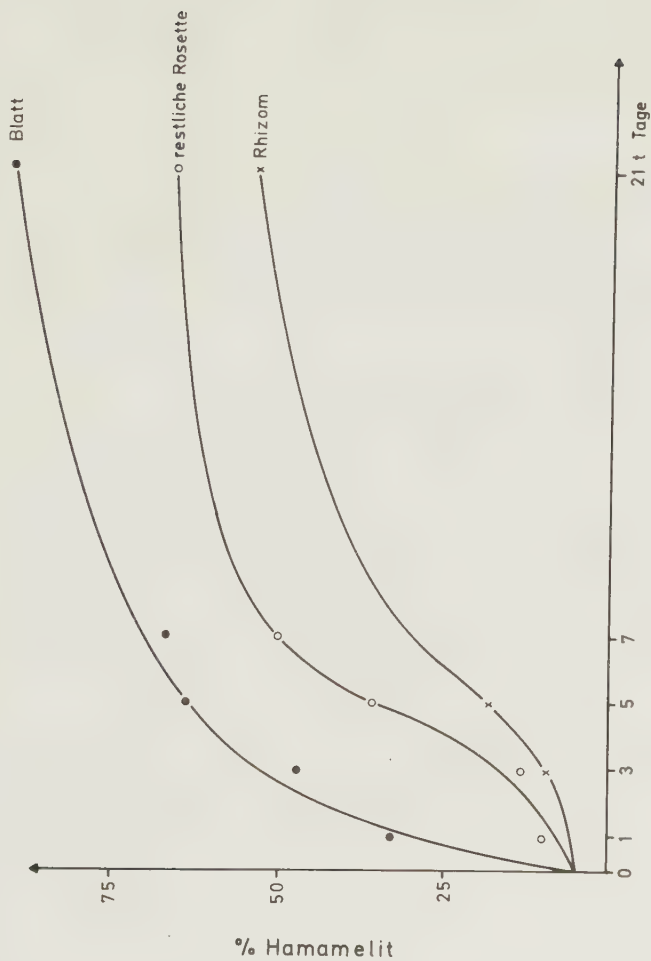


Abb. 4

Die Reduktion von Hamamelose zu Hamamelit in den verschiedenen Organen von *Primula elusiana*

kontinuierlich zu.

Neben Hamamelit, Clusianose und allenfalls dem hamamelithaltigen Glycosid konnten weiter keine radioaktiven Substanzen, die einen Metabolismus des Kohlenstoffgerüsts der Hamamelose andeuten, nachgewiesen werden.

3.2. Die Oxidation von Hamamelose durch Pseudomonas H 1

Da es selbst mit der verbesserten Fütterungstechnik nicht gelungen war, einen Abbau des Kohlenstoffgerüsts der Hamamelose in *Primula clusiana* nachzuweisen, wurde nun versucht, Bakterien zu finden, die Hamamelose verwerten können.

3.2.1. Isolierung der Hamamelose-oxidierenden Bakterien

Zur Isolierung solcher Organismen wurde 1 g Erde aus dem Wurzelbereich von *Primula clusiana** in 15 ml Nährlösung I aufgeschlämmt. Der Kontrollansatz enthielt keine Hamamelose. Die Probe mit Hamamelose zeigte nach zweitägiger Inkubation bei 30° C eine deutliche Zunahme der Trübung gegenüber der Kontrolle. Die Bakterien ließen sich auf einem festen Nährboden (Nährlösung I + 2 % Agar) weiterziehen. Mit Hilfe des Koch'schen Plattenverdünnungsverfahrens wurde dann eine Reinkultur hergestellt. Danach ließ sich der Bakterienstamm in einem Flüssigkeitsmedium nach Bitter et al. (10) kultivieren. Dieses enthält aber neben anorganischen Salzen noch Citrat und Pepton - Stoffe, die Bakterien als alleinige Nahrungsquelle nützen können.

Um zu zeigen, daß es sich bei Hamamelose in diesem Fall um einen echten Nährstoff handelt, wurde das Wachstum des iso-

* In Garten- und Komposterde konnten keine Hamamelose-verwertenden Bakterien gefunden werden

lierten Bakterienstammes in Abhängigkeit von der Hamamelosekonzentration im Medium II verfolgt. Abb. 5 zeigt die deutliche Korrelation von Wachstum und Hamamelosekonzentration in Bereichen, wie sie üblicherweise für Substrate benützt werden, und die optimalen Konzentrationen von Wachstumsfaktoren um ein Vielfaches übertreffen. Demnach ist Hamamelose für diese Organismen ein Nährstoff.

3.2.2. Identifizierung der Bakterien

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Bakterien zeigen gerade Stäbchen von $2,1 \times 0,8 \mu\text{m}$ mit polarer Begeißelung (Abb. 6). Sporenbildung konnte nicht beobachtet werden. Die Kolonien auf Agarplatten mit Nährlösung I und II waren rund, konvex, von glatter Oberfläche, durchscheinend weiß und zeigten unter UV-Licht (350 und 250 nm) keine Fluoreszenz. Die Flüssigkeitskultur in Nährlösung II war weißlich trüb und fluoreszierte unter UV-Licht (350 nm) schwach bläulich-weiß. Die Gram-Färbung war negativ. Dies wurde durch eine Zellwandpräparation nach Schleifer und Kandler (32) mit anschließender Aminosäureanalyse erhärtet. Die Bakterien wuchsen aerob ohne Gasentwicklung. Fermentativ konnte auch Glucose nicht verwertet werden. Der pH-Wert stieg bei der Anzucht in der Nährlösung II von 6,4 auf 8,4.

Auf Grund dieser Beobachtungen ist dieser Stamm nach Bergey's Manual (12) und Schmidt-Lorenz (33) der Gattung *Pseudomonas* zuzuordnen und erhielt die Bezeichnung H 1. Die in Tab. 4 aufgeführten weiteren Untersuchungen sollen der näheren Charakterisierung des Stammes dienen.

3.2.3. Inkubation der Bakterien mit radioaktiver Hamamelose

Um zu prüfen, in welcher Weise *Pseudomonas* H 1 Hamamelose verwertet, wurden Bakterien, die an Reservestoffen verarmt worden

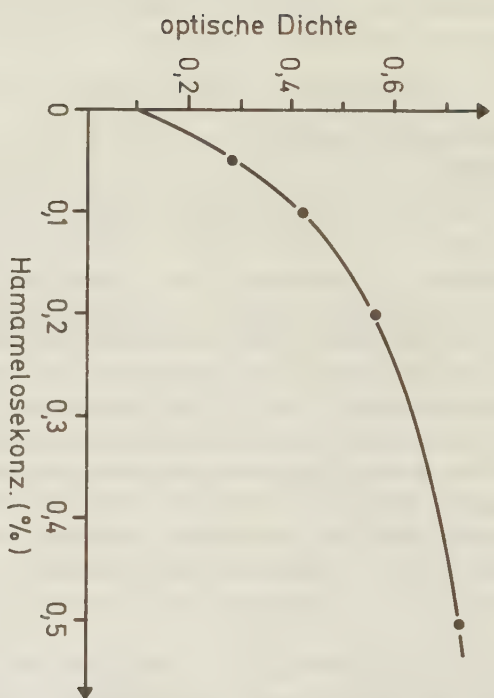


Abb. 5

Die Abhängigkeit des Wachstums von *Pseudomonas* (H1) von der Hamamelosekonzentration im Medium II



Abb. 6

Pseudomonas H 1

Elektronenoptisches Bild - Vergrößerung: 12 000 x

Aufnahme: Prof. Dr. F. Schötz, München

Tab. 4: Physiologische Reaktionen zur weiteren Charakterisierung
des *Pseudomonas*-Stammes H 1

Wachstum bei

30° C	Stäbchen 0,8 x 2,1 µm
37° C	Stäbchen länger als 10 µm
42° C	kein Wachstum

Wachstum in

Hefe-Dextrose, flüssig	gut
Milch	gut, ohne pH-Änderung
Peptonwasser	schwach

Zuckerverwertung, aerob in Nährmedium II

Glucose	positiv
Saccharose	positiv
Arabinose	negativ
Galactose	negativ
Maltose	negativ
Lactose	negativ
Raffinose	negativ
Gelatineverflüssigung	positiv
Caseinhydrolyse	positiv
Stärkehydrolyse	schwach
H ₂ S-Bildung	negativ
Nitratreduktion	negativ

waren (vgl. 2.10.), im Warburg-Gefäß mit radioaktiver Hamamelose unter Sauerstoff inkubiert. Der nun stark erhöhte Sauerstoffverbrauch wurde am Manometer verfolgt (Abb. 7). Als nach 8,5 Std. der Sauerstoffverbrauch deutlich abnahm, wurde der Versuch abgebrochen.

3.2.4. Identifizierung der Abbauprodukte

Die Bakterien wurden abzentrifugiert und zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Überstand und Waschwasser enthielten 98 % der eingesetzten Radioaktivität. Dementsprechend fand sich im alkoholischen Extrakt der Zellen sowie im unlöslichen Rückstand keine Radioaktivität mehr; ebenso verlief die Prüfung auf gebildetes $^{14}\text{CO}_2$ negativ.

Um zu prüfen, ob bei der Inkubation der Bakterien mit ^{14}C -Hamamelose flüchtige ungeladene oder saure Abbauprodukte gebildet worden waren, wurden aliquote Teile des bei der Zentrifugation erhaltenen Überstandes im alkalischen (pH 8,0) bzw. sauren Milieu (pH 3,5) je dreimal am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht, wobei vor jeder Destillation etwas Wasser zugesetzt worden war. Da die im Rückstand verbliebene Radioaktivität jeweils der der Ausgangslösung gleich war, war das Vorliegen flüchtiger Substanzen auszuschließen.

Die radioaktive Lösung wurde nun papierelektrophoretisch sowie -chromatographisch weiter untersucht. Bei der Elektrophorese im alkalischen (Triäthylaminacetat-Puffer pH 9,7) und sauren (Ammoniumformiat-Puffer pH 3,7) Puffer ergaben sich jeweils 2 radioaktive Banden, von denen die stärkere (Fraktion I, 65 % der eingesetzten Radioaktivität) ungeladen war, während die schwächere (Fraktion II, 35 % des eingesetzten ^{14}C) wie eine einbasische Säure wanderte. Die Papierchromatographie der Fraktion II in 3 Fließmittelsystemen ergab jeweils das Vorliegen zweier radioaktiver Verbindungen, die sich im wäßrigen Medium immer wieder ineinander umwandelten, also wohl 2 in

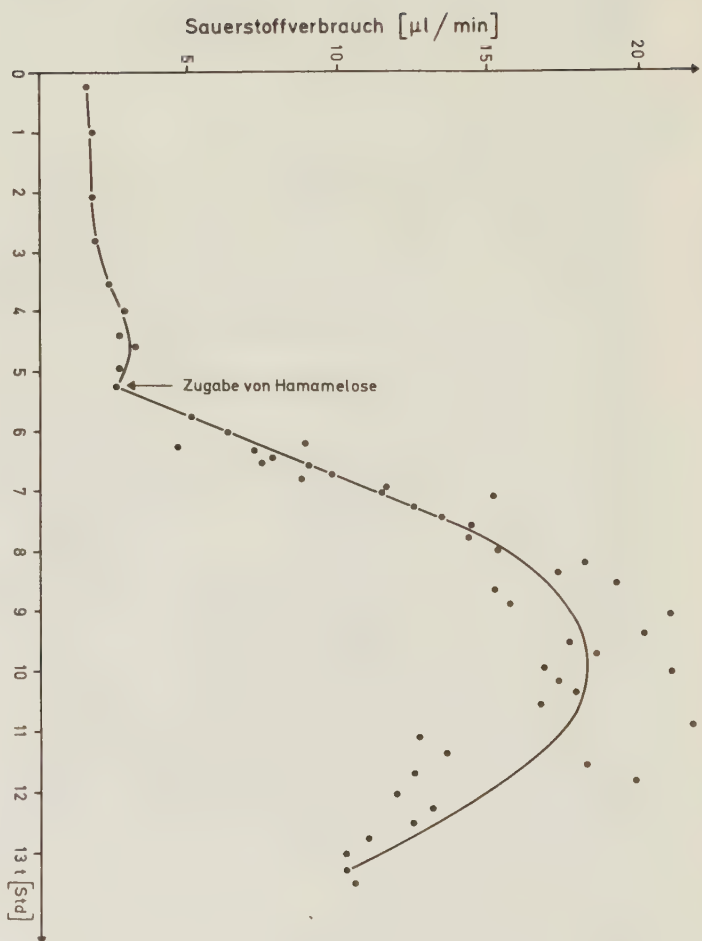


Abb. 7
Der Sauerstoffverbrauch von *Pseudomonas* H 1 vor und nach Zugabe von Hamamelose

Tab. 5: R_{Glucose} -Werte von Hamamelonsäure und Hamamelonsäurelacton im Vergleich mit denen anderer Zucker bei der Papierchromatographie

Verbindung	R_{Glucose} -Wert im Fließmittelgemisch		
	1	2	3
Hamamelonsäure	0,91	0,48	0,24
Hamamelonsäurelacton	1,89	1,45	1,83
Hamamelose	1,50	1,51	1,27
Hamamelit	1,54	1,55	1,20
Xylose	1,35	1,25	1,30
Ribose	1,67	1,56	1,50

Tab. 6: $R_{\text{Pikrinsäure}}$ -Werte von Hamamelonsäure im Vergleich zu denen anderer Zuckersäuren bei Papierelektrophorese

1: 0,1 M Triäthylaminacetat-Puffer

2: 0,2 M Ammoniumformiat-Puffer

Verbindung	$R_{\text{Pikrinsäure}}$ -Wert im Puffersystem	
	1	2
Hamamelonsäure	1,05	0,49
Hamamelonsäurelacton	0,00	0,00
Gluconsäure	1,06	0,65
Glucuronsäure	1,14	0,89

Tab. 7: Retentionszeiten (min) der Trimethylsilyl-Derivate von Hamamelonsäurelacton und Hamamelonsäure im Vergleich mit denen entsprechender Derivate von Gluconsäure-1,4-lacton, Gluconsäure und Hamamelose bei Gaschromatographie

Hamamelonsäurelacton	26,2
Hamamelonsäure	33,5
Gluconsäure-1,4-lacton	29,8
Gluconsäure	33,8
Hamamelose	27,1; 28,5; 29,5

einem Gleichgewicht auftretende Formen einer einzigen Substanz darstellen. Die eine Form erwies sich bei erneuter Papier-elektrophorese als einbasische Säure, während die andere ungeladen war. Da beide Formen sowohl mit alkalischem Silbernitrat (41) wie auch mit Perjodat/Benzidin (13) reagierten, war anzunehmen, daß es sich um Anion und Lacton einer Oxysäure handelt. Da die Verbindung aus Hamamelose gebildet worden war, lag die Vermutung nahe, daß es sich um Hamamelonsäure handelte. Ein Vergleich der radioaktiven Säure mit authentischer Hamamelonsäure (39) ergab bei Papierchromatographie in 3 Fließmittelsystemen (Tab. 5) sowie bei Papierelektrophorese in 2 verschiedenen Puffersystemen (Tab. 6) völlige Übereinstimmung, sowohl in den Laufstrecken von Anion und Lacton als auch in der Aufspaltung in die beiden Formen.

Übereinstimmung ergab sich ferner bei der Gaschromatographie der Trimethylsilyl-Derivate (Tab. 7).

Schließlich konnte die Identität noch durch Cokristallisation der Kaliumsalze bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität bestätigt werden. Die papierchromatographische Analyse der Fraktion I des Überstandes ergab, daß es sich um ein Gemisch aus Hamamelonsäurelacton und nicht umgesetzter Hamamelose handelt.

Die Befunde zeigen, daß bei Inkubation des *Pseudomonas*stammes H 1 mit Hamamelose Hamamelonsäure als einziges Produkt auftritt. Demnach können diese Organismen Hamamelose nur als Wasserstoff-, nicht aber als Kohlenstoffquelle nützen. Dies erklärt, warum H 1 zum Wachstum außer Hamamelose weitere organische Substanzen benötigt.

3.2.5. In vitro-Versuche zur Oxidation von Hamamelose

Es wurden Versuche angestellt, um die Oxidation der Hamamelose durch *Pseudomonas* H 1 im zellfreien System zu untersuchen. Dazu wurden die Bakterien abzentrifugiert, in 0,1 M Phosphat-

Puffer pH 6,4 aufgenommen und mittels einer X-press* oder Ultraschall aufgeschlossen.

Es konnte jedoch trotz Zugabe von NAD^+ , NADP^+ , ATP und MgCl_2 bzw. FAD, FMN, Diaphorase und Methylenblau zu diesem Rohextrakt keine Oxidation von Hamamelose nachgewiesen werden.

3.3. Die aerobe und anaerobe Dissimilation von Hamamelose durch Kluyvera citrophila Stamm 627

Bei der Oxidation von Hamamelose durch Pseudomonas H 1 zu Hamamelonsäure bleibt das Kohlenstoffgerüst erhalten. Es wurde deshalb weiter versucht, Organismen zu finden, die auf einem synthetischen Medium mit Hamamelose als einziger organischer Substanz zu leben vermögen. Damit wäre gewährleistet, daß die verzweigte Kohlenstoffkette angegriffen wird.

3.3.1. Die Isolierung von Hamamelose-dissimilierenden Bakterien

Bei der Applikation von ^{14}C -Hamamelose an Blätter von Primula clusiana durch Einstellen der Blattbasen in die radioaktive Lösung war bei einem Versuch $^{14}\text{CO}_2$ nachgewiesen worden. Dies legte die Vermutung nahe, daß von den Blättern Hamamelose-dissimilierende Bakterien in die zu applizierende Lösung gelangt waren. Daher wurde zur Isolierung von Hamamelose-dissimilierenden Bakterien ein vergilbendes Blatt von Primula clusiana in Stücke zerschnitten. Diese wurden dann in ca. 3 ml Hamamelose-Lösung bei Zimmertemperatur 3 Tage lang inkubiert. Aus dem nun trüben Überstand wurden durch mehrmaliges Überimpfen in 5 ml Nährlösung III kleine bewegliche Stäbchen angereichert. Das Koch'sche Plattenverdünnungsverfahren ergab davon eine Reinkultur, die sich in Nährlösung III weiterziehen ließ.

* Fa. Biox, Schweden

Die Bakterien können auf Schrägagar (Nährlösung III + 2 % Agar) 6 bis 8 Monate bei + 2° C aufbewahrt werden und sind nach 3 bis 4 Passagen im flüssigen Medium erneut auf Schrägagar 6 bis 8 Monate lebensfähig.

3.3.2. Identifizierung der Bakterien

Elektronenoptische Bilder (Abb. 8) des isolierten Bakterienstammes zeigten gerade, peritrich begeißelte (2 Geißeln) Stäbchen. Die Größe beträgt 1,5 x 0,7 µm. Sporenbildung wurde nicht beobachtet. Auf Agarplatten mit Nährlösung III bilden die Bakterien weiße, runde Kolonien mit glatter konvexer Oberfläche. Die Gram-Färbung war negativ. Dies wurde auch bei diesem Stamm mittels einer Zellwandpräparation nach Schleifer und Kandler (32) mit anschließender Aminosäureanalyse bestätigt. Die physiologischen Eigenschaften dieses Bakterienstammes sind in Tab. 8 zusammengestellt.

Nach diesen Befunden und gemäß den Gärungsprodukten aus Glucose (3.3.5.1.) sind diese Bakterien in die Familie der Enterobacteriaceen zu stellen. Sie zeigen deutliche verwandtschaftliche Beziehungen zu *Escherichia coli*. Der hier beschriebene Bakterienstamm unterscheidet sich von *E. coli* nur durch die aerobe Verwertung von Citrat und Glycerin als Kohlenstoffquelle. Am nächsten kommt er damit den Bakterienstämmen, die Asai aus Abwasser isolierte und *Kluyvera citrophila* nannte (1). Die 3 von Asai isolierten Stämme sind bei ATCC unter den Stamm-Nummern 14236-14238 erhältlich. Es wurde geprüft, ob auch einer dieser Stämme Hamamelose verwerten kann. Dazu wurden die einzelnen Stämme im Glucose-haltigen Nährmedium IV angezogen. 1 ml dieser Suspension wurde in 5 ml Nährlösung III eingepflegt. Diese Organismen waren nach 14 Std. gut angewachsen. Nun wurde mit einer Öse wiederum in 5 ml Nährlösung III weitergeimpft. Nach 24 Std. zeigten diese Proben keine Trübung. Wurde nun sterilisierte Glucose-Lösung zugegeben, so waren diese Proben bereits nach weite-



Tab. 8: Physiologische Reaktionen der Hamamelose-
abbauenden Bakterien

Methylrottest	positiv
Voges-Proskauer	negativ
Citratverwertung	positiv
Lysindecaboxylase	positiv
Ornithindecaboxylase	positiv
Argininhydrolase	negativ
H ₂ S-Bildung	negativ
Indol-Bildung	negativ
Lactoseverwertung	nach 4 Tagen positiv
Glycerinverwertung	
aerob	positiv
anaerob	negativ
KCN-Resistenz	positiv
Phenylalanin-desaminase	negativ
Gelatineverflüssigung	negativ
Glucoseverwertung	siehe 3.3.5.1.

ren 8 Std. bewachsen. Parallelproben, denen keine Glucose nachträglich zugesetzt worden war, zeigten auch nach 4 Tagen kein Wachstum.

Die Bakterien waren demnach 14 Std. lang bei Anwesenheit von Hamamelose neben Glucose gewachsen, waren aber dann nicht fähig, mit Hamamelose als alleiniger Nahrungsquelle zu leben. Daß es dabei nicht am Minimalmedium lag, zeigte das rasche Wachstum der Bakterien nach Zugabe von Glucose. Aus diesen Befunden ist zu schließen, daß die ATCC-Stämme von *K. citrophila* Hamamelose nicht als Nahrungsquelle verwerten können. Keiner dieser Stämme ist also identisch mit dem oben beschriebenen Neu-Isolat. Dieses wurde der Sammlung der gram-negativen Eubakterien am Institut für Milchwirtschaft, Weißenstephan, eingegliedert und erhielt hier die Stammbezeichnung *Kluyvera citrophila* Nr. 627.

In Anbetracht der nahen Verwandtschaft von *K. citrophila* 627 zu *Escherichia coli* - *Kluyvera citrophila* wurde von Asai wieder zu *Escherichia coli* gestellt (2) - wäre denkbar, daß *Escherichia coli* Hamamelose abzubauen vermag. Der Stamm *Escherichia coli* K 10 wurde daraufhin nach der oben beschriebenen Methode auf Hamameloseverwertung untersucht; doch auch diese Organismen zeigten auf Hamamelose kein Wachstum.

3.3.3. Die aerobe Dissimilation von Hamamelose durch *Kluyvera citrophila* Stamm 627

Um die Verwertung von Hamamelose unter Sauerstoff näher zu untersuchen, wurde radioaktiv markierte Hamamelose an eine dichte Bakteriensuspension von *K. citrophila* 627 gefüttert. Dazu wurden 200 ml einer 24 Std. alten Kultur abzentrifugiert und erneut in 3 ml Nährmedium III suspendiert. Unter Zugabe von 1 mg ^{14}C -Hamamelose (0,25 μCi) wurden die Bakterien in den Hauptraum eines Warburg-Gefäßes gebracht und dann dieses verschlossen. Im Mitteleinsatz befand sich 4 N KOH

mit einem Filterpapierstreifen. Langsamer Austausch von Luft war über eine Glaskapillare (Durchmesser 0,5 mm, Länge 10 cm) möglich, die auf den Kamin des Warburg-Gefäßes aufgesetzt war. Es sollte auf diese Weise vermieden werden, daß entstehendes $^{14}\text{CO}_2$ entweicht. Inkubiert wurde 6 Std. lang bei 30°C auf einem Schüttelbrett. Nach Versuchsende wurde die Radioaktivität des $^{14}\text{CO}_2$ wie beschrieben (2.5.3.) gemessen. Das Kulturmedium wurde durch ein bakteriendichtes Filter gesaugt und die Bakterien mit Wasser nachgewaschen. Die Radioaktivität der vereinigten Filtrate wurde in einem aliquoten Teil bestimmt; die chromatographische Untersuchung ergab, daß es sich nur um ^{14}C -Hamamelose handelte.

Um radioaktive Stoffe, die sich noch in den Zellen befinden, auswaschen und bestimmen zu können, wurden die Bakterien erneut abgenutscht, nachdem durch Zugabe von Toluol die Bakterienmembranen zerstört worden waren. Die aus den Bakterien auf diese Weise nicht extrahierbare Radioaktivität wurde bestimmt, indem das Filter mit den Bakterien im Toluol-Cocktail im Scintillationszähler gemessen wurde.

Wie Tab. 9 zeigt, wurden rund 70 % der Hamamelose zu CO_2 abgebaut. 22 % der Radioaktivität waren noch im Medium als nicht umgesetzte Hamamelose. Der Rest - etwa 8 % - befand sich in den Bakterien. Aus diesen Daten ist eindeutig ersichtlich, daß die umgesetzte Hamamelose fast ausschließlich zu CO_2 oxidiert worden war. Bietet man also Hamamelose unter Sauerstoff einer dichten Bakteriensuspension von *K. citrophila* 627 an, so wird das Hamamelose-Molekül vornehmlich zu CO_2 veratmet.

In einem weiteren Versuch wurde eine Wachstumskurve von *K. citrophila* 627 auf Hamamelose (Konzentration 0,3 %) erstellt. Dazu wurden 10 ml der Nährlösung III mit *K. citrophila* 627 beimpft und bei 30°C auf dem Schüttelbrett inkubiert. In gewissen Zeitabständen wurde der Kultur 1 ml entnommen. Nach Bestimmung der optischen Dichte am Spectralphotometer bei

Tab. 9: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität auf Medium (^{14}C -Hamamelose), CO_2 und Bakterien nach Fütterung von ^{14}C -Hamamelose an *Kluyvera citrophila* Stamm 627

Medium (^{14}C -Hamamelose)	22,0
CO_2	69,7
Bakterien	
mit Toluol extrahierbar	1,6
mit Toluol nicht extrahierbar	6,4

Tab. 10: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Produkte bei Vergärung von ^{14}C -Hamamelose durch *Kluyvera citrophila* Stamm 627 (Vergärungszeit 20 min - 30°C)

Produkte	wiedergefundene Radioaktivität
CO_2	1,3
Äthanol	35,4
Essigsäure	13,1
Ameisensäure	10,7
Milchsäure	17,5
Bernsteinsäure	1,9
Monophosphate	0,7
Resthamamelose + in den Bakterien festgelegte Radio- aktivität	18,7

600 nm wurde mit Hilfe der Methode nach Folin und Wu (16) in einem aliquoten Teil die Menge an verbliebener Hamamelose gemessen.

Wie Abb. 9 zeigt, ist der Verbrauch an Hamamelose in den ersten 25 Std. mit dem Anstieg der Zellzahl der Bakterien in der Kultur (gemessen als optische Dichte) streng korreliert, d. h. einer logarithmischen Zunahme der optischen Dichte entspricht eine logarithmische Abnahme der Hamamelosekonzentration. Aus der Kurve ergibt sich unter den gegebenen Bedingungen eine Generationszeit von 3,5 Std. Nach 25 Std. geht die Bakterienkultur in die stationäre Phase über, nach 40 Std. tritt deutliches Absterben ein. Das unverminderte Absinken des Hamamelosegehalts im Medium nach 25 Std. ist dem Energiestoffwechsel der nun dichten Bakteriensuspension in der stationären Phase zuzuschreiben.

Der Anstieg der Hamamelosekonzentration nach 40 Std. ist wohl auf das Auftreten anderer reduzierender Substanzen bei der Lyse der Bakterien in der Absterbephase zurückzuführen. Diese Stoffe werden bei der Zuckerbestimmung nach Folin und Wu ebenfalls oxidiert und täuschen so einen zu hohen Zuckergehalt vor.

3.3.4. Die Vergärung der Hamamelose

3.3.4.1. Wachstum der Bakterien im Hochagar

Fertigt man von *K. citrophila* 627 eine Stichkultur im Hochagar (Nährlösung III + 2 % Agar) an, so zeigen die Bakterien nach 3 Tagen Wachstum unter Gasentwicklung.

3.3.4.2. Puffervergärung von Hamamelose

Zur genaueren Analyse der Gärungsprodukte aus Hamamelose wurde eine Puffervergärung mit ^{14}C -Hamamelose (0,75 μCi) durchgeführt.

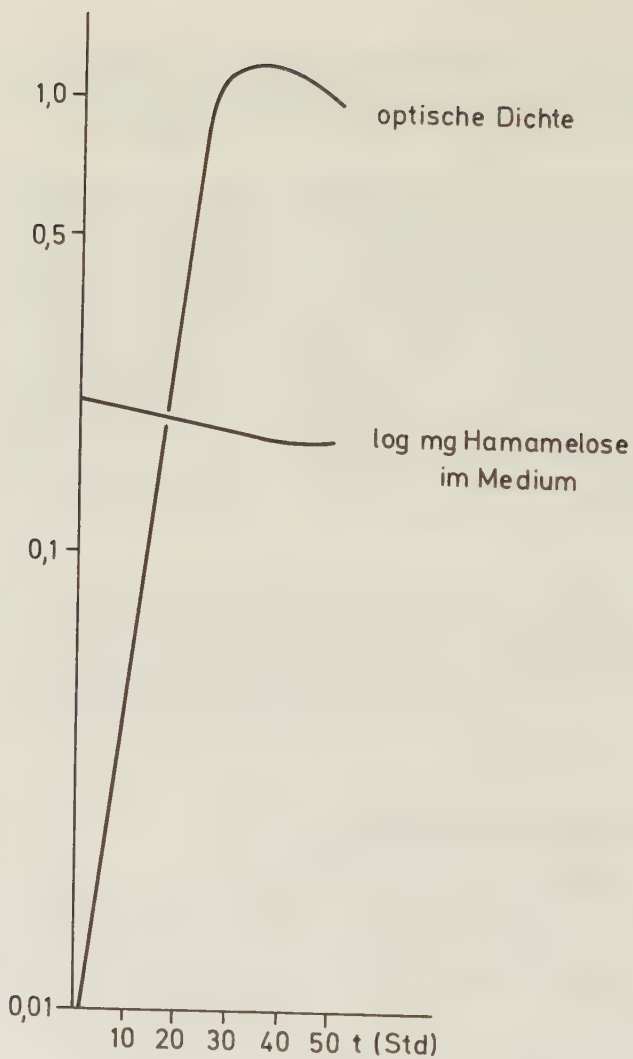


Abb. 9

Wachstumskurve und Hamameloseverbrauch
von *Kluyvera citrophila* 627 in Nährmedium III

3.3.4.3. Prüfung auf Gärungsprodukte

Um zu prüfen, ob neutrale bzw. saure flüchtige Produkte bei der Vergärung von Hamamelose durch *K. citrophila* 627 entstanden waren, wurden aliquote Teile des Überstandes am Rotationsverdampfer im alkalischen und im sauren Milieu jeweils dreimal zur Trockne abgedampft, wobei jedesmal der Rückstand mit Wasser aufgenommen wurde. Der Vergleich der Radioaktivität der Ausgangslösung mit der im Rückstand verbliebenen zeigte, daß sowohl flüchtige neutrale als auch flüchtige saure Produkte bei der Gärung entstanden waren.

3.3.4.3.1. Identifizierung der flüchtigen neutralen Substanz

Ein Teil des Überstandes wurde zur Abtrennung der flüchtigen neutralen Substanz nach einer Vorschrift von Neish (28) bei pH 8 destilliert. Das Destillat enthielt 19,1 % der Radioaktivität des Überstandes.

Da zu vermuten war, daß es sich bei dem fraglichen radioaktiven Abbauprodukt um Äthanol handelt, wurde das Destillat, ehe weitere Identifizierungsschritte unternommen wurden, mit etwa 0,3 mmol Äthanol als Trägersubstanz versetzt. Dann wurde mit schwefelsaurer Dichromatlösung oxidiert. Zum Auffangen von eventuell entstehendem CO_2 wurde Barytlauge vorgelegt und diese dann auf Radioaktivität geprüft: Es war jedoch kein $^{14}\text{CO}_2$ nachzuweisen. Das Reaktionsgemisch wurde dann destilliert und das Destillat auf einer Kieselgelsäule wie unter 2.3.3. beschrieben chromatographiert. Die radioaktive Substanz verhielt sich dabei wie authentische Essigsäure. Die im neutralen Milieu destillierbare Substanz war demnach Äthanol.

3.3.4.3.2. Identifizierung der bei der Gärung entstehenden Säuren

Ein aliquoter Teil des Überstandes wurde der Ätherextraktion unterworfen und der Extrakt auf einer Kieselgelsäule mit

authentischen Säuren cochromatographiert. Gefunden wurden radioaktive Ameisensäure, Essigsäure und Milchsäure. Da sich auf dieser Säule Milchsäure und Bernsteinsäure nicht trennen lassen, wurde das Verhältnis dieser beiden Säuren zueinander durch Papierchromatographie bestimmt.

Dazu wurde der Überstand mit Kalilauge neutralisiert und auf etwa $\frac{1}{5}$ des ursprünglichen Volumens eingeeengt. Das dabei ausfallende K-Perchlorat wurde abzentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation ließ sich im Fließmittelsystem II chromatographieren. Neben Milchsäure, Bernsteinsäure und unvergorener Hamamelose zeigte sich noch ein radioaktiver Fleck, der seinem Laufverhalten nach aus Monophosphaten bestehen könnte. Tab. 10 gibt die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen identifizierten Substanzen wieder.

3.3.5. Der Abbauweg der Hamamelose in Kluyvera citrophila Stamm 627

3.3.5.1. Die Vergärung von Glucose durch Kluyvera citrophila Stamm 627

Ist die Zusammensetzung der Gärungsprodukte aus Hamamelose eine Besonderheit des Hamamelose-Abbaus oder sieht die Gärungsbilanz einer geradkettigen Hexose ebenso aus? Lassen sich also unter Umständen aus den Gärungsprodukten schon Rückschlüsse auf Reaktionen des Hamamelose-Abbaus ziehen? Zur Prüfung dieser Fragen wurden $0,3 \text{ mmol } ^{14}\text{C}$ -U-Glucose (spez. Radioaktivität $5 \text{ } \mu\text{Ci}/\text{mmol}$) mit *K. citrophila* 627 vergoren. Hierfür wurden Bakterien, die auf Glucose herangewachsen waren, verwendet. Die Isolierung, Identifizierung und Messung der Gärungsprodukte geschah wie im vorausgehenden Versuch. Das Ergebnis ist in Tab. 11 aufgeführt.

In einem weiteren Versuch wurden dann $0,1 \text{ mmol } ^{14}\text{C}$ -Glucose (spez. Radioaktivität $25 \text{ } \mu\text{Ci}/\text{mmol}$) in gleicher Weise vergoren. Der Unterschied zum vorausgehenden Versuch bestand darin, daß die Bakterien für diese Vergärung auf Hamamelose an-

Tab. 11: Prozentuale Verteilung des ^{14}C auf die Abbauprodukte nach Vergärung von Glucose- $\text{U-}^{14}\text{C}$ durch *Kluyvera citrophila* Stamm 627 nach Anzucht auf Glucose bzw. Hamamelose (Vergärungszeit 90 min - 30°C)

Anzucht der Zellen	mit Glucose	mit Hamamelose
spez. Aktivität der applizierten Glucose- $\text{U-}^{14}\text{C}$	5 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$	25 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$
% der in den Gärungsprodukten gefundenen Radioaktivität		
CO_2	2,2	0,5
Äthanol	31,0	18,5
Essigsäure	12,5	11,0
Ameisensäure	5,8	7,5
Milchsäure	30,0	43,7
Bernsteinsäure	3,2	0,0
Unlösliches (in den Bakterien festgelegte Radioaktivität)	12,5	17,2

gezogen worden waren. Dies bedingte auch die geringere eingesetzte Zuckermenge mit einer höheren spezifischen Radioaktivität, denn es war damit zu rechnen, daß diese Organismen die Glucose schlechter umsetzen. In Tab. 11 ist die Bilanz dieser Vergärung dargestellt.

Die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Gärungsprodukte in diesen beiden Versuchen ist gleich. Die Abweichungen liegen innerhalb des bei diesen Organismen zu beobachtenden Spielraums*. Glucose wird also offensichtlich über den gleichen Stoffwechselweg abgebaut, gleichgültig ob die Bakterien auf Glucose oder auf Hamamelose angezogen worden waren.

* Das Verhältnis der gebildeten Mengen an Milchsäure und Bernsteinsäure war in den einzelnen Versuchen verschieden. Die geringe Produktion von Bernsteinsäure im Vergleich zu Angaben in der Literatur bei *Escherichia coli* (Stokes (38): 0,34 mmol Succinat/1 mol Glucose) ist auf die Begasung mit reinem Stickstoff zurückzuführen. Bei Inkubation unter CO_2 oder wenn durch die Formiat-Hydrogen-Lyase CO_2 freigesetzt wird, kann Phosphoenolpyruvat carboxyliert werden. Das dabei entstehende Oxalacetat wird dann zu Succinat reduziert. Unter anaeroben Bedingungen ist dies jedoch nur soweit möglich, wie endogenes CO_2 aus Decarboxylierungsreaktionen zur Verfügung steht.

So fand auch Tikka (40) bei Vergärung von Glucose durch *Escherichia coli* wechselnde Mengen an Bernsteinsäure. Selbst in Parallelproben gelang es manchmal nicht, eine Produktion von Bernsteinsäure nachzuweisen.

Die Angaben aus der Literatur über die Menge an Milchsäure, die von *Escherichia coli* aus einem mol Glucose gebildet wird, differieren ebenfalls sehr stark; eine erhöhte Milchsäureproduktion geht offensichtlich immer auf Kosten der Summe aus den C_1 - und C_2 -Bruchstücken und umgekehrt. Tikka (40) berichtete

Die Zusammensetzung der Gärungsprodukte aus Glucose wie auch aus Hamamelose ist für die gemischte Säuregärung vieler Enterobacteriaceen wie z. B. *Escherichia coli* typisch. Bezeichnend dafür ist eine Pyruvat-Formiat-Lyase-Reaktion, in der Pyruvat in Acetyl-Coenzym A und Formiat gespalten wird (27). Das Acetyl-Coenzym A wird in der Regel phosphorolytisch unter Bildung von Acetyl-Phosphat gespalten. Dieses

über eine pH-Abhängigkeit der Milchsäureproduktion. Stokes konnte die pH-Abhängigkeit nur im Phosphat-Puffer bestätigen, nicht jedoch im Carbonat-Puffer. Bei den hier mitgeteilten Versuchen war sowohl die Art des Puffers wie auch das pH konstant. Und dennoch konnten Milchsäureanteile zwischen 1,5 und 43,7 % festgestellt werden. Gerade bei geringen Zuckerkonzentrationen scheint eine Korrelation zwischen der gefütterten Zuckermenge und der Menge an gebildeter Milchsäure zu bestehen. Verringert man die Konzentration der Hamamelose sehr stark, so erhält man überhaupt keine Milchsäure mehr. Ob die Tendenz zur Milchsäurebildung wirklich von der Zuckerkonzentration abhängt, oder ob diese indirekt durch die erhöhte Ameisensäureproduktion und damit doch wieder über das pH wirkt, ist hier nicht zu entscheiden. Es könnte auch durch das größere Angebot an Metaboliten - z. B. FDP (44) - die Pyruvat-Reduktion gegenüber der Pyruvat-Spaltung favorisiert werden. Zudem muß man bedenken, daß die Messung der Radioaktivität der Gärungsprodukte nicht unbedingt der wirklichen Gärungsbilanz entspricht. Durch die Messung der Radioaktivität allein, wie sie hier erfolgte, werden Zuflüsse aus endogenen Reservestoffen der Organismen nicht erfaßt. Dieser Zufluß endogener Substanzen kommt natürlich bei Vergärung sehr kleiner Mengen an ^{14}C -markierten Verbindungen bei der Aufstellung einer Gärungsbilanz besonders stark zum Tragen.

wiederum kann unter Bildung von ATP zu Essigsäure dephosphoryliert oder zu Äthanol reduziert werden. Weitere Charakteristika sind die Spaltung von Formiat in CO_2 und Wasserstoff sowie das Unvermögen, Acetoin unter Freisetzung von CO_2 aus Pyruvat zu bilden (45).

Auffallend bei allen Puffervergärungen mit *K. citrophila* 627 war die geringe Produktion von CO_2 , obwohl beim Wachstum im Hochagar deutlich Gas produziert wurde. Doch ist aus Untersuchungen von Stephenson (37) bekannt, daß Zellsuspensionen von *Escherichia coli* unter anaeroben Bedingungen aus Glucose kein Gas freisetzen, wenn die Organismen aerob angezogen waren. Sie bilden dann keine Formiat-Hydrogen-Lyase, sondern scheiden Ameisensäure aus. Entsprechendes scheint auch für *K. citrophila* 627 zu gelten.

3.3.5.2. Der Abbauweg der Glucose in *Kluyvera citrophila* Stamm 627

Im folgenden sollte nun geklärt werden, über welchen Stoffwechselweg die Glucose durch *K. citrophila* 627 abgebaut wird, da nach der Gärungsbilanz zu vermuten war, daß auch der Hamameloseabbau zumindest teilweise auf dem gleichen Weg erfolgt.

Der Pentosephosphatweg und seine Modifikation (z. B. bei *Leuconostoc mesenteroides*) zeichnen sich durch die Produktion von CO_2 aus. Aus Tab. 11 ist jedoch ersichtlich, daß *K. citrophila* 627 fast kein CO_2 produziert. Damit ist sicher, daß Glucose auf diese Weise nicht abgebaut wird.

Das Auftreten der Gärungsprodukte Äthanol, Acetat, Formiat und Milchsäure läßt sich auch über Stoffwechselwege erklären, die zu homofermentativer Gärung führen können: Sowohl über die Glycolyse wie über den Entner-Doudoroff-Weg entstehen letztlich 2 mol Pyruvat aus einem mol Glucose. Lediglich die weiteren Reaktionen von Pyruvat entscheiden dann über den Gärungstyp.

Ob von einem Organismus einer dieser beiden Stoffwechselwege beschritten wird, läßt sich durch die Vergärung von Glucose-1- und -6- ^{14}C entscheiden. Bei beiden Abbauewegen müßte aus Glucose-1- ^{14}C wie auch aus Glucose-6- ^{14}C etwa die gleiche Menge an ^{14}C -Lactat entstehen.

Mit der Vergärung von Glucose-1- ^{14}C läßt sich dann zudem entscheiden, welcher der beiden Abbauewege beschritten wird. Beide Stoffwechselwege liefern zwar nur Pyruvat aus Glucose, doch bei der Vergärung über den Entner-Doudoroff-Weg erscheint nicht das C_3 -Atom der Glucose, wie im Fall der Glycolyse, in der Carboxylgruppe des Pyruvats, sondern das C_1 -Atom (21; vgl. Abb. 10).

Um nun zu entscheiden, ob *K. citrophila* 627 Glucose auf einem dieser beiden Stoffwechselwege zu Pyruvat abbaut und um gegebenenfalls zu entscheiden, welcher der beiden Wege beschritten wird, wurden jeweils 0,1 mmol Glucose-1- ^{14}C , Glucose-6- ^{14}C und Glucose-U- ^{14}C der Puffervergärung durch *K. citrophila* 627 unterworfen. Da sich aus den bisherigen Versuchen ergab, daß die quantitative Zusammensetzung der Gärungsprodukte ohne erkennbare Ursache in weiten Grenzen streute, wurden die Glucosen von Bakterien aus der gleichen Anzucht auf Hamamelose vergoren. Auf diese Weise konnten Unterschiede bei der Anzucht der Bakterien ausgeschlossen und die Ergebnisse direkt miteinander verglichen werden. Tab. 12 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs.

Sowohl aus Glucose-1- ^{14}C als auch aus Glucose-6- ^{14}C erschienen über 50 % der vergorenen Radioaktivität in der Milchsäure. Dies ist nur erklärlich, wenn die Glucose in zwei 3-C-Bruchstücke, also zu 2 Molekülen Pyruvat abgebaut wird.

Zur Entscheidung darüber, welcher der beiden in Frage kommenden Abbauewege beschritten wird, muß man normalerweise die Positionsmarkierung der entstandenen Milchsäure mit Hilfe eines chemischen Abbaus untersuchen. Dies ist aber bei dem vorliegenden Versuch nicht notwendig, da die Bakterien selbst

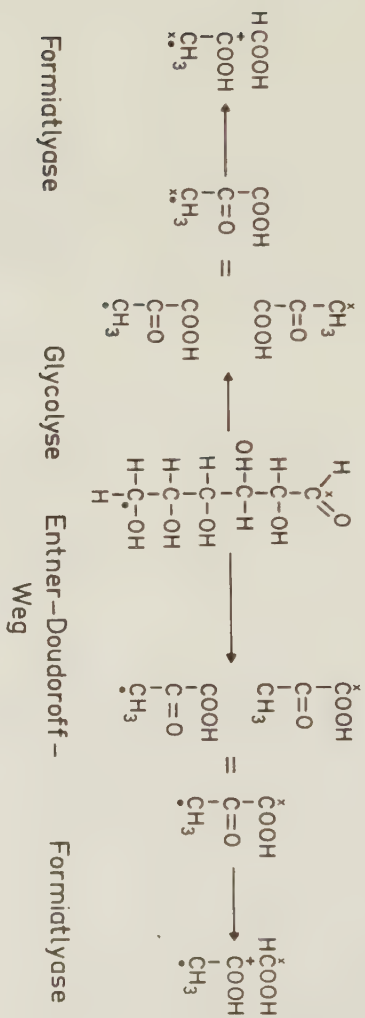


Abb. 10

Die Beziehungen zwischen den Positionen der Glucose und denen des Pyruvats bei der Vergärung der Glucose über die Glycolyse bzw. den Entner-Doudoroff-Weg

Tab. 12: Prozentuale Verteilung des ^{14}C auf die Abbauprodukte nach Vergärung gleicher Mengen von Glucose- $\text{U-}^{14}\text{C}$, $-1\text{-}^{14}\text{C}$ und $-6\text{-}^{14}\text{C}$ durch *Kluyvera citrophila* Stamm 627
(Vergärungszeit 90 min - 30°C / Anzucht der Bakterien auf Hamamelose)

^{14}C -markierte Position		^{14}C -U-	^{14}C -1-	^{14}C -6-
spez. Aktivität der applizierten Glucose		25 $\frac{\mu\text{Ci}}{\text{mmol}}$	50 $\frac{\mu\text{Ci}}{\text{mmol}}$	50 $\frac{\mu\text{Ci}}{\text{mmol}}$
% der in den Gärungsprodukten gefundenen Radioaktivität	CO_2 Äthanol Essigsäure Ameisensäure Milchsäure Unlösliches (in den Bakterien festgelegte Radioaktivität)	0,5 18,5 11,0 7,5 43,7 17,2	0,2 26,0 9,8 0,8 55,4 5,9	0,0 23,2 9,0 0,8 60,8 4,8

das Pyruvat spalten: Durch die Pyruvat-Formiatlyase-Reaktion erscheint die Carboxylgruppe des Pyruvats als Formiat (27).

Wie aus Tab. 12 hervorgeht, enthält aber die Ameisensäure bei Vergärung von Glucose-1- ^{14}C und Glucose-6- ^{14}C keine Radioaktivität.

Die hier erhaltenen Daten zeigen also klar, daß die Glucose über die Glycolyse abgebaut wurde.

Da die Produkte bei der Vergärung von Glucose (Tab. 11) auch der Zusammensetzung der Gärungsprodukte aus Hamamelose (Tab. 10) entsprechen, kann der Schluß gezogen werden, daß der Kohlenstoff der Hamamelose an irgendeiner Stelle in den Abbauweg der Glucose, also in die Glycolyse, eingeschleust wird.

3.3.5.3. Anreicherung von Zwischenprodukten des Hamameloseabbaus

Einen unmittelbaren Hinweis auf einen Stoffwechselweg liefert jedoch erst die Identifizierung von Zwischenprodukten. Es wurde daher versucht, nach der Fütterung von ^{14}C -Hamamelose an *K. citrophila* 627 radioaktiv markierte Zwischenprodukte zu erfassen und zu identifizieren. Um dabei einerseits anabolische Reaktionen weitgehend zu unterdrücken, andererseits auch die Totaloxidation zu CO_2 auszuschalten, wurde bei der Suche nach Zwischenstufen des Hamameloseabbaus die Puffervergarung von Hamamelose-U- ^{14}C gewählt. Bei dem oben (S. 46, Tab. 10) beschriebenen Vergärungsversuch war bei der Papierchromatographie des Überstandes neben Hamamelose, Milchsäure und Bernsteinsäure eine unbekannte radioaktive Substanz aufgetreten, die 0,7 % der wiedergefundenen Radioaktivität enthielt. Für eine Identifizierung war jedoch die darin enthaltene Radioaktivität zu gering.

In einem weiteren Versuch wurde nun ^{14}C -Hamamelose von höherer spezifischer Radioaktivität eingesetzt und die Dauer des Ver-

suchs auf 5 min verkürzt, denn es mußte verhindert werden, daß der ganze angebotene Zucker vergoren wird und damit die Pools der Zwischenprodukte wieder auf einen sehr kleinen steady-state-Wert absinken. Unter den gewählten Bedingungen konnte der Anteil des in der unbekannten Substanz enthaltenen Radiokohlenstoffs auf 8,4 % gesteigert werden. Somit war eine Identifizierung möglich.

3.3.5.4. Isolierung und Identifizierung von Zwischenprodukten des Hamameloseabbaus

Auf Grund des Laufverhaltens bei der Papierchromatographie im Fließmittelsystem II und bei der Elektrophorese in Puffer 1 ergab sich die Vermutung, daß es sich bei der unbekannten Substanz um Zuckermorphosphate handelt. Nach Inkubation mit saurer Phosphatase und anschließender Papierchromatographie im Fließmittelsystem III zeigte das Autoradiogramm 5 Flecken. Ein Fleck - 1 - lief mit Hamamelose gleich und zeigte auch deren charakteristische Doppelkontur. Fleck 2 wurde durch Cochromatographie als Glucose identifiziert. Die Verbindung 3 ergibt mit Ameisensäurem Benzylamin (3) keine Reaktion und bleibt daher bei anschließender Elektrophorese in Na-Formiat-Puffer am Start sitzen. Dieser Befund, sowie das Laufverhalten der Substanz in den Fließmittelsystemen II und III wiesen diese als Hexit aus. Bei Cochromatographie in den Fließmittelgemischen 2 und 3 und Coelektrophorese in Boratpuffer mit verschiedenen Zuckeralkoholen (Tab. 1) verhielt sich die unbekannte Substanz wie Mannit. Die Identität konnte durch Co-kristallisation der radioaktiven Substanz mit authentischem Mannit bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität bestätigt werden. Substanz 4 und 5 waren bedeutend schwächer radioaktiv markiert. Die Verbindung 4 erwies sich als Fructose; die Substanz 5 zeigte sich bei Papierchromatographie in den Fließmittelgemischen 1, 2 und 3 sowie bei Elektrophorese in Boratpuffer (Tab. 1) identisch mit Mannose.

Die identifizierten Monophosphate und deren relative Anteile an der Radioaktivität sind in Tab. 13 zusammengestellt.

5.3.5.5. Strukturaufklärung der Zuckermonophosphate

5.3.5.5.1. Fructose-Phosphat und Glucose-Phosphat

Durch die kurzzeitige Puffervergärung von ^{14}C -Hamamelose hoher spezifischer Radioaktivität konnte in einem weiteren Ansatz so viel ^{14}C -markiertes Fructose-P und Glucose-P erhalten werden, daß weitere Versuche zur Strukturermittlung angestellt werden konnten. Zunächst wurde geprüft, ob es sich um Fructose-6-P handelt. Dazu wurden die Zuckermonophosphate, die zu 64,5 % aus Hamamelose-P, zu 32,1 % aus Fructose-P und zu 3,4 % aus Glucose-P bestanden, mit Phosphohexose-Isomerase und Glucose-6-P-Dehydrogenase sowie NADP inkubiert. Dabei reagiert Fructose-6-P über Glucose-6-P zu Gluconsäure-6-P (9), das sich als zweifach geladenes Anion elektrophoretisch gut von den Monophosphaten abtrennen läßt.

Nach Ablauf der Reaktion müßten 32,1 % (Fructose-P) und 3,4 % (Glucose-P) der Radioaktivität in dem zweifach geladenen Produkt erscheinen. Bei der Elektrophorese des Reaktionsgemisches bei pH 3,7 wanderten aber nur 3,5 % der eingesetzten Radioaktivität als zweifach geladene Substanz, also gerade so viel, wie auf das Glucose-P entfällt. Authentisches Fructose-6-P ergab jedoch quantitative Umsetzung. Bei dem bei der Hamamelosevergärung entstandenen Fructose-P kann es sich also nicht um das 6-Phosphat gehandelt haben. Demnach ist zu vermuten, daß Fructose-1-P vorlag.

Dagegen kann mit Sicherheit gesagt werden, daß es sich beim Glucose-P um Glucose-6-P handelt, da aus den gesamten Monophosphaten derjenige Teil an Radioaktivität, der dem Anteil der Glucose entsprach, zu Gluconsäure-6-P oxidiert worden war. Gluconsäure wurde nach Dephosphorylierung durch Papierchromatographie im Fließmittel 3 nachgewiesen.

Tab. 13: Die Zusammensetzung der Zuckermonophosphate nach
 Puffervergärung von ^{14}C -Hamamelose
 (Vergärungszeit 5 min - 30°C)
 Die Radioaktivität der gesamten Zuckermonophosphate
 wurde = 100 % gesetzt

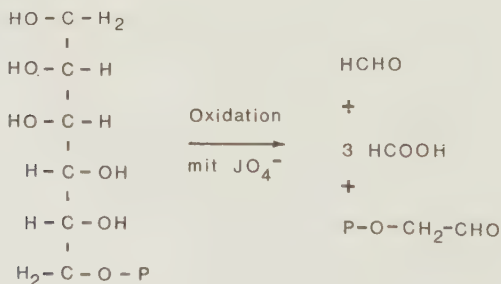
Hamamelose-Phosphat	(1)	15,4 %
Glucose-Phosphat	(2)	6,2 %
Mannit-Phosphat	(3)	74,0 %
Fructose-Phosphat	(4)	3,1 %
Mannose-Phosphat	(5)	1,1 %

3.3.5.5.2. Mannit-Phosphat

Um das Mannit-P näher zu untersuchen, mußte es von den übrigen Phosphateestern abgetrennt werden. Dazu wurden die Zuckermonophosphate zweimal 36 Std. lang im Laufmittel 3 absteigend chromatographiert. Es zeigten sich zwei radioaktive Banden. Dephosphorylierung eines aliquoten Teils und Chromatographie der langsamer laufenden Bande zeigte das Vorliegen von Mannit-P neben Glucose-P an. Zur Entfernung des Glucose-6-P wurden die beiden Phosphatester mit Glucose-6-P-Dehydrogenase inkubiert und das Gluconsäure-6-P elektrophoretisch abgetrennt.

Die Struktur des auf diese Weise gereinigten Mannit-P wurde nach Perjodat-Oxidation mit Hilfe der Isotopenverdünnungsmethode (2.14.1.) ermittelt. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tab. 14 zusammengestellt.

Bei uniformer ^{14}C -Markierung des Mannitteils läßt sich die gefundene Verteilung der Radioaktivität auf die Spaltprodukte nur mit folgendem Reaktionsschema vereinbaren:



Demnach handelt es sich bei der untersuchten Verbindung um Mannit-1-P (= Mannit-6-P).

Die Überprüfung der ^{14}C -Markierung des Mannits geschah ebenfalls durch Perjodat-Oxidation. Das Ergebnis zeigte, daß Mannit im Mannit-P uniform markiert war.

Tab. 14: Radioaktivität in den Spaltprodukten nach Perjodat-Oxidation von Mannit-Phosphat und Mannit

Eingesetzte Radioaktivität	9503 dpm			4536 dpm	
	theoretisch* zu erwartende Radioaktivität (dpm) in den Spaltprodukten	gemessene Radioaktivität	theoretisch* zu erwartende Radioaktivität (dpm) in den Spaltprodukten	gemessene Radioaktivität	
gespaltenes Produkt	Mannit-3-P	Mannit-2-P	Mannit-1-P	Mannit	Mannit
Formaldehyd	3168	1584	1584	1512	1444
Ameisensäure	1584	3168	4752	3024	2952
Rest	4752	4752	3168	-	-

* unter der Voraussetzung der uniformen Markierung

3.3.5.5.3. Mannose-Phosphat

Die Radioaktivität im Mannose-P war für eine Strukturaufklärung zu gering.

3.3.5.5.4. Hamamelose-Phosphat

Zur Sturkturaufklärung des Hamamelose-P mußte dieses von allen übrigen Zuckermomophosphaten abgetrennt werden. Wie sich aber herausstellte, verhält sich Fructose-P bei der Papierelektrophorese und Papierchromatographie wie Hamamelose-P. Da Fructose-P als 1-Phosphat vorlag, konnte dieses auch nicht mit im Handel verfügbaren Enzymen zu einem Produkt umgesetzt werden, das sich dann abtrennen ließe. Mit den zur Verfügung stehenden Methoden waren also Hamamelose-P und Fructose-1-P nicht voneinander zu trennen.

Nach den bisherigen Ergebnissen war klar, daß *K. citrophila* 627 eine Hamamelosekinase besitzen muß. Daher wurde untersucht, ob der Proteinrohextrakt aus *K. citrophila* 627 nicht Hamamelosekinaseaktivität besitzt und Hamamelose-P damit darstellbar sei. Dazu wurde aus *K. ctripbila* 627 nach der unter 2.13. beschriebenen Methode ein Proteinrohextrakt gewonnen und folgende Inkubationsmischung zusammengestellt:

4,9	ml	0,1 M Phosphatpuffer pH 6,4
0,02	mmol	MgCl ₂
0,1	mmol	ATP
5	ml	Proteinrohextrakt
0,1	ml	¹⁴ C-Hamamelose (= 1 µCi)

Dieses Gemisch wurde 15 min lang bei Zimmertemperatur inkubiert. Durch 5 min Erhitzen auf 95° C wurden dann die Proteine denaturiert und anschließend der Niederschlag abzentrifugiert. Nach Gefriertrocknung wurde der Überstand der Elektrophorese in Ammoniumformiat-Puffer unterworfen. Es zeigten sich dabei

zwei Banden: Eine am Start (5,7 %) und eine, die wie ein Monophosphat lief (94,3 %).

Die einfach geladene Substanz wanderte bei Papierchromatographie im Fließmittel 3 wie ein Zuckermorphosphat. Nach Dephosphorylierung ergab sich bei zweidimensionaler Chromatographie im Fließmittelsystem III ein einziger Fleck, der mit Hamamelose identisch war. Demnach enthielt der Proteinrohextrakt aus *K. citrophila* 627 Hamamelosekinaseaktivität. Mit deren Hilfe war es dann möglich, soviel ^{14}C -markiertes Hamamelose-P rein darzustellen, daß die Struktur dieser Verbindung weiter untersucht werden konnte.

Liegt Hamamelose-P als Hamamelose-1-P vor, so ist die Carbonylgruppe des Zuckers blockiert und kann mit Natriumborhydrid nicht zur Alkoholgruppe reduziert werden. Ist sie jedoch unverestert, so ergibt die Reduktion Hamamelit-P.

Eine wäßrige Lösung von ^{14}C -Hamamelose-P wurde mit Natriumborhydrid versetzt. Nach 18-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde mit Essigsäure angesäuert und dann gefriergetrocknet. Aus dem Reaktionsgemisch wurde die radioaktive Verbindung durch Elektrophorese isoliert und mit saurer Phosphatase dephosphoryliert. Nach Elektrophorese des freigesetzten Zuckers in Boratpuffer konnte gezeigt werden, daß 97,5 % der Hamamelose zu Hamamelit reduziert worden waren. Demnach ist auszuschließen, daß Hamamelose-P am C_1 -Atom phosphoryliert war.

Die weitere Strukturaufklärung geschah dann am Hamamelit-P durch Perjodat-Oxidation und Untersuchung der Spaltprodukte mit der Isotopenverdünnungsmethode. Tab. 15 gibt einen Vergleich der Mengen an Ameisensäure und Formaldehyd, die theoretisch für die einzelnen Phosphorylierungsstellen zu erwarten sind, mit den tatsächlich gefundenen wieder.

Die Werte weisen auf das Vorliegen von Hamamelose-2¹-P hin. Allerdings wurden unter den gewählten Bedingungen nur 64 % der theoretisch zu erwartenden Ameisensäure erhalten. Es er-

Tab. 15: Durch Perjodatspaltung der verschiedenen Hamamelitmono-
phosphate entstehende Mengen an Ameisensäure und Formaldehyd

Phosphorylierungs- stelle	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₂ ¹	Gemessene Werte
Ameisensäure [*]	1	0	0	1	2	1,3
Formaldehyd [*]	1	2	1	1	2	2,0

^{*} angegeben in mol/mol Hamamelit-Phosphat

schien aber nicht oportun, um einer Ausbeuteverbesserung willen die oxidierenden Bedingungen zu verschärfen, da dann die Gefahr der Überoxidation des Formaldehyds besteht. Die erhaltenen Werte sind eindeutig, da eine Kombination von 1 mol Ameisensäure und 2 mol Formaldehyd bei keinem der Hamamelosemonophosphate erwartet werden kann. Die Phosphorylierung an C₂ ist demnach als gesichert anzusehen. Außerdem konnte die Phosphorylierungsstelle C₂ durch Spaltung eines positions-¹⁴C-markierten Hamamelit-P bestätigt werden.

3.3.5.6. Markierungskinetik der Zwischenprodukte des anaeroben Hamameloseabbaus

Nachdem Hamamelose-2¹-P beim anaeroben Hamameloseabbau nachgewiesen worden war, lag es nahe, als ersten Schritt des Hamamelose-Katabolismus' eine Phosphorylierung dieser Hexose anzunehmen. Doch ergab die Identifizierung der übrigen Zuckermomophosphate keinerlei Hinweis auf ihre Sequenz bei der Hamamelosevergärung.

Mannit-1-P enthält zwar am meisten Radioaktivität von allen gefundenen Monophosphaten, doch sagt dies in Anbetracht der relativ langen Vergärungszeit von 5 min noch nicht, daß es damit Folgeprodukt von Hamamelose-P sein muß. Es war aber immerhin die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß Hamamelose-P zum Hamamelit-P reduziert und dieses dann zum Mannit-P umgelagert wird. Letzteres könnte nach Oxidation zu Mannose-P in Glucose-P und Fructose-P überführt werden. In diesem Fall war zu erwarten, daß die als Hamamelose-2¹-P angesprochene Substanz auch Hamamelit-P enthält. Es konnte aber durch Boratelektrophorese nachgewiesen werden, daß es sich ausschließlich um Hamamelose-P handelt. Demnach war es wahrscheinlicher, daß Mannose-P und Mannit-P einem anabolischen Stoffwechselweg angehören.

Es wurde nun versucht, Auskunft über die Reihenfolge des Auftretens der Zwischenprodukte beim Hamameloseabbau durch die Kinetik ihrer Markierung mit ^{14}C nach Applikation radioaktiv markierter Hamamelose zu erhalten. Es wurde dafür Hamamelose mit einer ca. 30fach höheren spezifischen Radioaktivität eingesetzt, um auch diejenigen Zuckermorphosphate, die nur in sehr kleinen Pools auftreten, so stark zu markieren, daß eine hinreichend genaue Messung möglich ist.

Die Vergärung wurde wie unter 2.12. beschrieben durchgeführt. In gewissen Zeitabständen wurden Proben des Gäransatzes entnommen und ihre Zusammensetzung wie üblich analysiert.

Bei der Elektrophorese bei pH 3,7 zeigten sich nun drei Banden: Eine aus ungeladenen Substanzen, eine aus einfach geladenen und eine aus zweifach geladenen Substanzen.

Die Bande aus ungeladenen Substanzen wurde im Fließmittelsystem III papierchromatographisch untersucht. Sie enthielt nur Hamamelose. Die bei der Elektrophorese wandernden Banden wurden eluiert und zunächst im Fließmittel 3 chromatographiert. Es zeigte sich jeweils wiederum nur eine einzige Bande, wobei sich die eine wie ein Zuckermorphosphat, die andere wie ein Zuckerdiphosphat verhielt. Nach Dephosphorylierung mit saurer Phosphatase wurden die Spaltprodukte im Fließmittelsystem III analysiert. Die zweifach geladene Bande ergab nach der Dephosphorylierung radioaktive Fructose und Glycerinsäure, die demnach offensichtlich aus Fructose-DP und Phosphoglycerinsäure freigesetzt worden waren. Die Monophosphat-Bande lieferte nach der Dephosphorylierung Hamamelose, Glucose und Fructose. Mannose-P und Mannit-P konnten bei diesem Versuch nicht gefunden werden.

Die einzelnen Substanzen und deren Anteile an der eingesetzten Radioaktivität sind in Tab. 16 wiedergegeben. Man sieht, daß in den ersten Minuten der Vergärung die prozentualen Anteile der einzelnen Substanzen am eingesetzten ^{14}C den stärksten Veränderungen unterworfen sind. Diese Phase ist in Abb. 11

Tab. 16: Prozentuale Verteilung des ^{14}C bei Vergärung von ^{14}C -Hamamelose durch *Kluyvera citrophila* Stamm 627 in Abhängigkeit von der Zeit

Vergärungs- dauer	Nicht umge- setzte Hamamelose	Hamamelose- Phosphat	Fructose- Phosphat	Glucose- Phosphat	Fructose- Diphosphat	Phospho- glycerin- säure	Flüchtige Produkte
15 sec	85,4	1,5	9,2	0,0	2,5	1,4	0,0
60 sec	76,1	10,0	6,2	0,2	0,9	5,8	0,5
90 sec	72,1	11,9	3,0	0,3	1,1	6,4	5,2
2 min	67,0	12,4	1,0	0,3	1,1	2,1	16,0
3 min	53,6	12,2	0,4	0,2	0,4	1,6	31,4
4 min	52,4	10,9	0,2	0,2		1,1	35,3
5 min	46,7	14,1	0,2	0,2		0,5	38,1
7 min	40,4	13,8	0,1	0,1		0,7	44,9
10 min	33,2	13,7	0,1	0,1		0,5	52,4
15 min	28,5	11,9	0,0	0,0		0,3	59,1

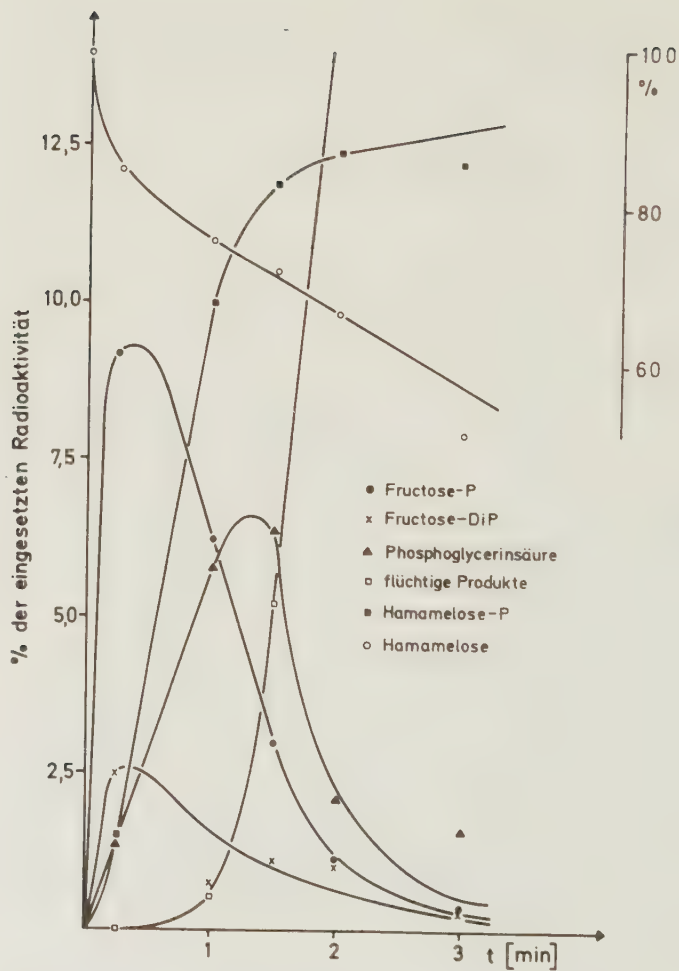


Abb. 11

Die prozentuale Verteilung des ^{14}C bei Vergärung von ^{14}C -Hamamelose durch *Kluyvera citrophila* 627 in Abhängigkeit von der Zeit

graphisch dargestellt.

Am schnellsten und sehr stark markiert wird Fructose-P, dann folgt Fructose-DP. Beide Fructose-Phosphate verlieren jedoch sehr rasch wieder ^{14}C . Mit dem Verschwinden von Fructose-P und Fructose-DP reichert sich ^{14}C -Phosphoglycerinsäure an, überschreitet ein Maximum und verliert Radiokohlenstoff offensichtlich an die flüchtigen Produkte. Glucose-P zeigt eine langsame Kinetik der Radioaktivitätszu- und -abnahme. Einen ganz anderen Kurvenverlauf weist die ^{14}C -Markierung des Hamamelose-P auf: Auf eine verlängerte lag-Phase folgt eine rasche Aktivitätszunahme. Der nach Durchlaufen eines Aktivitätsmaximums bei den anderen Phosphaten beobachtete ^{14}C -Verlust bleibt jedoch aus. Vielmehr hält sich in der Suspension ein ^{14}C -konstantes Niveau an Hamamelose-P. Diese gänzlich andersartige Charakteristik deutet auf ein Regulationsphänomen zu Beginn der Puffervergärung hin, das dafür verantwortlich sein könnte, daß Hamamelose-P als erstes Produkt des Hamameloseabbaus erst relativ spät ^{14}C anreichert.

Auffällig ist weiterhin, daß die ^{14}C -Abnahme der eingesetzten Hamamelose offensichtlich zwei Phasen durchläuft: Auf einen anfänglich sehr raschen Aktivitätsverlust folgt nach etwa 15 sec eine langsame aber stetige ^{14}C -Abnahme.

Eine Erklärung dafür, daß bei diesem Versuch weder Mannose-P noch Mannit-P gefunden wurde, brachte die parallele Puffervergärung recht unterschiedlicher Hamamelosemengen. Wird wenig ^{14}C -Hamamelose angeboten, so werden nur Hamamelose-P, Fructose-P und Glucose-P radioaktiv markiert, bei Vergärung einer größeren Menge von Hamamelose wurden noch Mannose-P und Mannit-P gebildet.

Die bisherigen Ergebnisse ergaben nun folgende Vorstellung über den Abbauweg der Hamamelose: Hamamelose wird zu Hamamelose-2¹-P phosphoryliert und dieses in Fructose-1-P umgelagert.

Nach einem weiteren Phosphorylierungsschritt zu Fructose-DP ist mit diesem Metaboliten bereits der Anschluß an die Glycolyse geschaffen, in der Fructose-DP über Triose-P, Phosphoglycerinsäure zu Pyruvat abgebaut wird. Dieses unterliegt dann den in Enterobacteriaceen des Coli-Typs bekannten Reaktionen. Glucose-6-P und die bei manchen Versuchen auftretenden Phosphate von Mannose und Mannit entstammen demnach anabolischen Reaktionen und stellen somit eine Abzweigung des Abbauwegs dar. Diese Vorstellungen über den Abbauweg der Hamamelose in *K. citrophila* 627 sind in Abb. 12 dargestellt.

5.5.6. Die Umwandlung von Hamamelose-2¹-Phosphat in Fructose-1-Phosphat

Der entscheidende Schritt beim Hamameloseabbau ist in der Umwandlung von Hamamelose-2¹-P in Fructose-1-P zu sehen. Diese Umwandlung kann nur geschehen, indem eine C-C-Bindung gespalten und eine neue geknüpft wird. Als Reaktionsmechanismus sind, wie bei der Biosynthese der Hamamelose aus einer unverzweigt-kettigen Hexose, mehrere Möglichkeiten gegeben:

1. Das Hamamelose-Molekül wird zwischen den Kohlenstoffatomen 2 und 3 zu freiem Glycerinaldehyd-P (C_1 , C_2 , C_{21}) und freiem Glycerinaldehyd (C_3 , C_4 , C_5) gespalten. Glycerinaldehyd-P wird dann zu Dihydroxyaceton-P umgelagert und die beiden Spaltstücke durch eine Aldolkondensation wieder zusammengefügt zu Fructose-1-P. Dabei wird, da eine Kondensation von C_4 mit C_{21} wegen des Phosphatesters blockiert ist, das C_{21} der Hamamelose zum C_1 der Fructose und das C_1 zum C_3 .
2. Der Umbau vollzieht sich wie unter 1 beschrieben, nur mit dem Unterschied, daß die beiden Spaltstücke nicht frei werden und daher kein Austausch mit entsprechenden Pools in der Zelle möglich ist; der Mechanismus ist dann der einer intramolekularen Umlagerung. Dabei ist eine Oxidation der Hydroxylgruppe am C_2 zur Ketogruppe und eine Reduktion der Aldehydgruppe am C_1

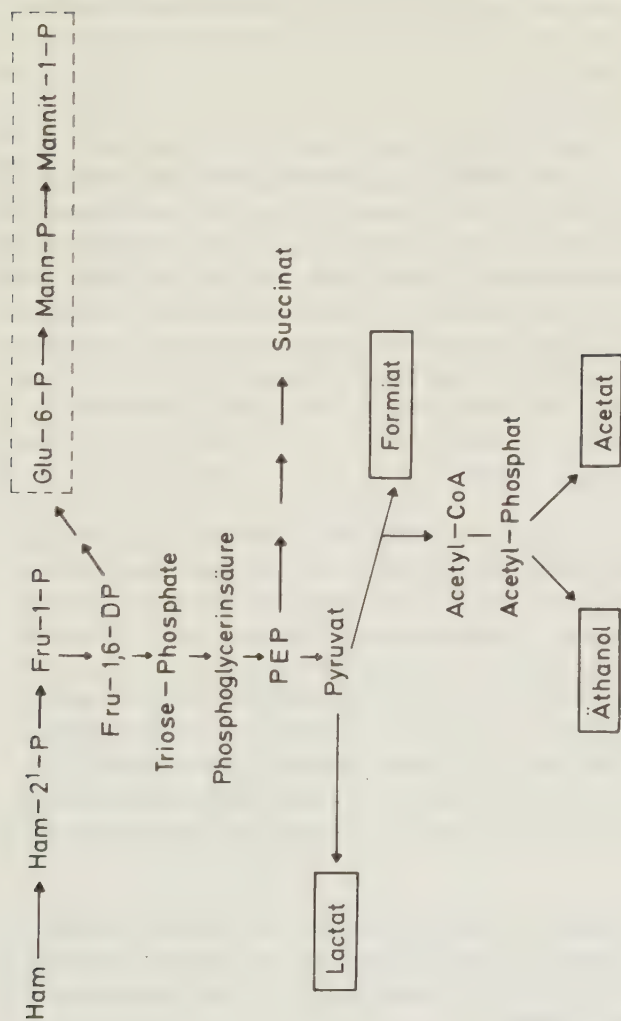


Abb. 12

Der Weg des Kohlenstoffs bei der Puffervergärung von Hamamelose durch *Kluyvera citrophila* 627

zur Alkoholgruppe zu fordern. Die Positionen der Kohlenstoffatome in der Hamamelose verhalten sich dabei genauso, wie im vorhergehenden Fall: C₃, C₄, C₅ der Hamamelose werden zu C₄, C₅, C₆ der Fructose; C₂ bleibt C₂, C₂¹ der Hamamelose wird zum C₁ der Fructose und C₁ zum C₃.

3. In Umkehrung einer Hypothese Shemyakins et al. (46) zur Biosynthese verzweigtkettiger Zucker wäre eine intermediäre Oxidation am C₂¹ zum Carbanion mit anschließender Acyloinkondensation zwischen C₂¹ und C₁ denkbar. Die dann folgende reduktive Spaltung der Bindung zwischen C₂ und C₂¹ ergäbe ein Aldohexose-P. Die Art der Umlagerung ist vom Mechanismus her sehr ungewöhnlich und führt entweder zu Allose-P oder Altrose-P und nicht zum Fructose-1-P. Dieser Reaktionsmechanismus läßt sich leicht durch eine Verfolgung der ¹⁴C-Markierung von den übrigen zwei Möglichkeiten unterscheiden: Es würde zwar das C₂¹ ebenfalls zum C₁, doch das C₁ der Hamamelose würde zum C₂ der Fructose und das C₂ zum C₃.

Um zwischen den unter 1 und 2 genannten Möglichkeiten unterscheiden zu können, muß man überprüfen, ob beim Umbau von Hamamelose-2¹-P zu Fructose-1-P beide 3-C-Hälften des Hamamelose-Moleküls im gleichen Umfang in Fructose eingebaut werden. Ein ungleicher Einbau würde jedenfalls auf einen Austausch der 3-C-Spalthälften mit ungleich schnell umgesetzten Pools dieser Metaboliten deuten; denn bei dem auch als Zwischenprodukt der Glycolyse auftretenden Glycerinaldehyd-P wäre ein wesentlich schnellerer Umsatz und damit ¹⁴C-Verlust zu erwarten, als bei dem vergleichsweise stoffwechselinerten freien Glycerinaldehyd.

Ein Hinweis, daß die erste Möglichkeit der Umwandlung nicht zutrifft, ergab sich aus der uniformen Markierung des Mannit-P. Diese widerspricht einem Austausch der 3-C-Spalthälften mit Pools dieser Metaboliten.

Ein weiteres Indiz gegen das intermediäre Auftreten der freien Spalthälften ergibt sich aus dem Befund, daß keine freie Triose nachgewiesen werden konnte; allerdings konnte auch kein Triose-P, das aber mit Sicherheit (Glycolyse) auftritt, entdeckt werden.

3.3.6.1. Versuche mit positionsmarkierter Hamamelose

Da die bisher angeführten Befunde keine eindeutige Antwort auf die gestellte Frage zuließen, wurde nun gezielt untersucht, ob die ^{14}C -Markierung aus beiden 3-C-Hälften der Hamamelose in gleichem Umfang in Fructose eingebaut wird. Diese Überprüfung ist in Folge der immer zu berücksichtigenden Aldolase- und Triosephosphat-Isomerase-Reaktion nur so möglich, daß Kohlenstoffatome der beiden 3-C-Hälften der Hamamelose ungleich markiert werden. Nach Umlagerung zur unverzweigtkettigen Hexose sollte dann nachgeprüft werden, ob die Ungleichverteilung des ^{14}C erhalten geblieben war. Für diesen Fall ist die intramolekulare Umlagerung wahrscheinlich. Tritt Gleichverteilung auf, dann wurde entweder alles über Triosephosphat-Isomerase ausgetauscht oder aber es erfolgte bei der Umwandlung von Hamamelose-P zu Fructose-1-P eine Spaltung in freie 3-C-Hälften.

Zu diesem Versuch wurde eine $\text{C}_2\text{1}+\text{C}_5$ -positions- ^{14}C -markierte Hamamelose eingesetzt, bei der $\text{C}_5 + \text{C}_1$ 32,9 %, $\text{C}_3 + \text{C}_4$ 12,8 % und $\text{C}_2\text{1} + \text{C}_2$ 54,2 % der Radioaktivität enthielten. Die getrennte Bestimmung des ^{14}C -Gehalts von C_5 (mit C_1) und $\text{C}_2\text{1}$ (mit C_2) gelang nach Phosphorylierung der Hamamelose zum 2^1-P , Reduktion und Perjodatspaltung des Hamamelit- 2^1-P (2.7.).

Nach 30 sec Vergärungsdauer wurden die Bakterien abgetötet, aus dem Überstand die Monophosphate isoliert und dephosphoryliert. Die freigesetzten Zucker bestanden zu einem überwiegenden Teil aus Hamamelose. Daneben konnte noch Mannit und etwas Glucose nachgewiesen werden.

Zur Bestimmung der ^{14}C -Verteilung im Glucose-Molekül wurde die aus den Zuckermomonophosphaten isolierte Glucose dem Leuconostoc-Abbau (18) unterworfen. Das Ergebnis ist in Tab. 17 dargestellt.

Die Radioaktivitätsverteilung in der Glucose zeigt gegenüber der in der eingesetzten Hamamelose eine ziemliche Angleichung des ^{14}C -Gehalts der beiden 3-C-Hälften. Dies dürfte durch Aldolase und Triosephosphat-Isomerase beim Übergang von Fructose-1-P zu Glucose-6-P bedingt sein. Daß dennoch eine gewisse Ungleichverteilung des ^{14}C in den beiden ursprünglich markierten Positionen erhalten blieb, zeigt, daß beim Übergang von Hamamelose-2¹-P zu Fructose-1-P die Spaltstücke nicht vom Enzym abdissoziieren, sondern bei der Bildung der neuen C-C-Bindung wieder miteinander reagieren.

Außerdem kann man vom Versuchsergebnis ableiten, daß aus dem Kohlenstoff-2¹ der Hamamelose das C₁ der Fructose wird und aus C₅ der Hamamelose das C₆ der Fructose - biogenetische Beziehungen, wie sie auch bei der Synthese von Hamamelose aus Fructose gefunden wurden.

3.5.6.2. Versuche zur Umlagerung des Hamamelosemonophosphates im zellfreien System und im Rohextrakt

Der im vorhergehenden Kapitel beschriebene Versuch liefert einen starken Hinweis dafür, daß die Umwandlung von Hamamelose-2¹-P zu Fructose-1-P durch eine intramolekulare Umlagerung geschieht. Eine weitere Stütze für diese Ansicht wäre zweifellos darin zu sehen, wenn es gelänge, die Umlagerung in vitro durchzuführen. In einem solchen Versuchsansatz könnte nämlich damit gerechnet werden, daß beim Auftreten freier, nicht enzymgebundener Spaltprodukte diese auch chromatographisch nachgewiesen werden könnten.

Tab. 17: Die Verteilung der Radioaktivität im Hamamelose- und im Glucose-Molekül

Hamamelose		Glucose	
$C_2^1 + C_2$	54,2 %	C_1	36,3 %
$C_3 + C_4$	12,8 %	$C_2 + C_3$	18,9 %
$C_1 + C_5$	32,9 %	C_4	8,1 %
		C_5	6,6 %
		C_6	29,1 %

Tab. 18: Die Zusammensetzung der Zuckermonophosphate nach Inkubation von Hamamelose mit dem Rohextrakt aus *Kluyvera citrophila* Stamm 627 und verschiedenen Coenzymen

Hamamelose-Phosphat	76,6 %
Fructose-Phosphat	18,6 %
Glucose-Phosphat	1,9 %
Mannit-Phosphat	2,4 %
Mannose-Phosphat	0,5 %

Bei der Inkubation von Hamamelose und ATP mit dem Rohextrakt aus *K. citrophila* 627 konnte neben Hamamelose-P kein weiteres Zuckermomorphosphat nachgewiesen werden. Es wurde nun weiterhin geprüft, ob das zellfreie System dann in der Lage ist, Hamamelose-P umzulagern, wenn dem Rohextrakt noch aufgeschlammte Zellwände zugesetzt werden. Doch auch in diesem zellfreien System konnte nur eine Phosphorylierung der Hamamelose beobachtet werden.

Es ist denkbar, daß am Umlagerungsprozeß des Hamamelose-P ein Redoxvorgang beteiligt ist. Die Coenzyme aus den Bakterien werden durch die Präparation des Rohextraktes sehr stark verdünnt, so daß dies den Umlagerungsprozeß limitieren könnte. Es wurden daher die Pyridinnucleotide in reduzierter bzw. oxidiert Form und in der Kombination dem Rohextrakt-Testansatz zugesetzt. Doch auch in diesen Fällen konnte jeweils nur Hamamelose-P aus dem Testgemisch isoliert werden.

Manche Enzyme werden durch ATP gehemmt. Es ist vorstellbar, daß gerade das ATP, das bei der Inkubation von Hamamelose mit dem Rohextrakt immer zugegeben wurde, die Umwandlung von Hamamelose-P inhibiert. Man könnte auch das Verhalten der Zwischenprodukte bei der Markierungskinetik (Abb. 11) in dieser Richtung deuten: Am Beginn des Versuchs ist sehr wenig ATP in den Bakterien vorhanden. Bei diesem niederen ATP-Spiegel wird das sich bildende Hamamelose-P sehr schnell zu Fructose-P umgelagert, und es kann sich kein Hamamelose-P in den Bakterien ansammeln. Erst wenn die ATP-liefernden Prozesse anlaufen, wird die Umwandlung von Hamamelose-P zu Fructose-P gehemmt und es kann sich der Pool an Hamamelose-P auffüllen, wobei im Gefolge der Pool an Fructose-P absinkt.

Zur Überprüfung dieser Vorstellung wurde deshalb in einem weiteren Versuch Hamamelose-P dem Proteinrohextrakt - nun ohne ATP - angeboten. Es wurde aber auch hierbei nicht umgesetzt.

Schließlich wurden in einem letzten Testansatz dem Rohextrakt folgende Substanzen zugegeben:

0,5	µCi	^{14}C -Hamamelose
3	mg	ATP
10	mg	Thiamin-Pyrophosphat
4	mg	Pyridoxalphosphat
je 2	mg	NAD^+ , NADH, NADP^+ , NADPH

Die Coenzyme wurden in 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,4 gelöst und nach Zugabe der Hamamelose mit 5 ml Rohextrakt versetzt. Inkubiert wurde 1 Std. bei Zimmertemperatur im Dunkeln.

Dabei entstanden nun mehrere Zuckermonophosphate. Neben dem immer noch dominierenden Hamamelose-P war nun auch beträchtliche Aktivität in Fructose-P sowie eine schwache Markierung von Glucose-P, Mannit-P und Mannose-P nachzuweisen. Die Radioaktivitätsverteilung ist in T 18 dargestellt.

Es wurde weder freie Triose noch Triose-P gefunden. Dies spricht sehr deutlich für eine intramolekulare Umlagerung. Neben Hamamelose-P tritt vor allem Fructose-P auf. Dies kann als deutlicher Hinweis gewertet werden, daß Fructose-1-P das unmittelbare Produkt der Umlagerung von Hamamelose-P ist.

4. Diskussion

4.1. Die Reduktion von Hamamelose zu Hamamelit in *Primula clusiana*

Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten über den Metabolismus von Hamamelose in höheren Pflanzen bestätigten die Ergebnisse von Sellmair und Kandler (36); auch mit einer verbesserten Fütterungsmethode war es nicht möglich, irgendwelche katabolischen Reaktionen der Hamamelose in Pflanzen nachzuweisen.

Selbst wenn man annimmt, daß durch die hohen Hamamelosekonzentrationen, die bereits in der Pflanze vorliegen können (wie im Fall von *Primula clusiana*), die applizierte ^{14}C -Hamamelose so stark verdünnt wird, daß eine genügende Markierung und damit der Nachweis von Zwischenprodukten nicht gelingt, so müßte doch nach längeren Expositionszeiten von Hamamelose nach der Pulsapplikation radioaktives CO_2 auftreten oder ein merklicher Einbau von Radioaktivität in die hydrolysierbare Fraktion erfolgen. Doch die wiedergefundene Radioaktivität in dieser Fraktion liegt deutlich unter 1 %, wobei man annehmen muß, daß die Werte eher Ungenauigkeiten in der Meßmethode widerspiegeln als Zeichen eines Umsatzes sind. Im deutlichen Gegensatz dazu werden bei Fütterung von Glucose bereits nach einem Tag fast 12 % des Radiokohlenstoffs als CO_2 exhaliiert, 10 % der wiedergefundenen Radioaktivität sind im Hydrolysierbaren und fast 5 % im Unhydrolysierbaren festgelegt.

Der Anteil an radioaktiver Substanz, der aus dem eben entrollten Blatt in die restliche Rosette abgeleitet wurde, schwankt erheblich, und so lassen sich über den Transport der applizierten Zucker in der Pflanze keine genaueren Angaben machen. Aus den gewonnenen Daten läßt sich allenfalls schließen, daß die Ableitung aus den Blättern ins Rhizom relativ geringfügig sein muß.

Als einzige Reaktion von Hamamelose in *Primula clusiana* wurde die von Sellmair und Kandler beschriebene Reduktion zu Hamamelit festgestellt.

Das unterschiedliche Verhältnis von Hamamelose zu Hamamelit (Abb. 4) im Blatt, an das appliziert wurde, in der restlichen Rosette und im Rhizom sind nicht darauf zurückzuführen, daß Hamamelose nur im eben entrollten Blatt reduziert werden kann. Es ist anzunehmen, daß dies auch in den Blättern der Rosette geschieht. Die scheinbare Verzögerung in der Hamamelosereduktion der restlichen Rosette und im Rhizom gegenüber der im eben entrollten Blatt kann einesteils durch den langsamen Transport der radioaktiven Substanzen erklärt werden. Andernteils fungieren Rhizom und restliche Rosette als Auffänger für ^{14}C -Hamamelose und ^{14}C -Hamamelit aus dem Blatt, an das erstere appliziert worden war. Diese Organe enthalten jedoch verschieden große Mengen an nicht radioaktiver Hamamelose und stellen somit Pools dar, in denen ^{14}C -Hamamelose verschieden stark verdünnt und dementsprechend verschieden schnell zu ^{14}C -Hamamelit reduziert wird.

Ein Maß für die Schnelligkeit des Umsatzes eines Metaboliten ist seine Halbwertszeit, also jene Zeit, in der die Hälfte der Substanz umgesetzt ist. Sie läßt sich bei Pulsmarkierung bestimmen. Für die Hamamelose im eben entrollten Blatt ergibt sich eine Halbwertszeit von 2,5 bis 3 Tagen. In der restlichen Rosette braucht die Hamamelose etwa $\frac{1}{4}$ Tage (berechnet

im Zeitraum der schnellsten Hamamelosereduktion um den 5. Tag) bis sie zur Hälfte reduziert ist, während im Rhizom dazu etwa 19 Tage benötigt werden.

Die Werte für die "restliche Rosette" und das Rhizom geben, wie oben besprochen, wohl nicht die tatsächliche Halbwertszeit für die Hamamelosereduktion in diesen Organen wieder, da die angegebenen Werte auch die Zeit für den Hamamelosetransport beinhalten.

Da auch Hamamelit neben der Reaktion mit Galactose zu Clusianose keinen Umsatz erkennen ließ, muß man annehmen, daß das Kohlenstoffgerüst der Hamamelose nicht mehr in den Stoffwechsel von *Primula clusiana* einbezogen werden kann. Dies gilt auch dann, wenn die Pflanzen einer extremen Hungersituation ausgesetzt sind. So ergaben sich aus den Versuchen, bei denen die Primelblätter dauernder Dunkelheit ausgesetzt waren, ebenfalls keine Hinweise auf einen Katabolismus der Hamamelose. Die Daten aus diesen Experimenten deuten lediglich darauf hin, daß die Reduktion von Hamamelose zu Hamamelit im *Primula clusiana* durch Licht im Vergleich mit Dauerdunkel auf das Doppelte beschleunigt wird. Der geringe Hamamelitanteil von 29,5 % nach 4 Tagen ist auf die bei diesen Versuchen verwendete Fütterungsmethode zurückzuführen: Die Blätter standen während des ganzen Versuchs in der radioaktiven Hamamelose-Lösung, so daß eine ständige Nachlieferung von Hamamelose erfolgte.

Eine mögliche physiologisch-ökologische Bedeutung der Hamamelose in den höheren Pflanzen für ihre Frostresistenz wurde von Sellmair und Kandler (36) eingehend diskutiert. Aus den vorliegenden Daten ergibt sich hierzu kein weiterer Anhaltspunkt.

Da Hamamelose von der Pflanze also nicht mehr abgebaut werden kann, müssen andere Organismen ihre Dissimilation übernehmen.

4.2. Die Oxidation der Hamamelose zu Hamamelonsäure durch Pseudomonas H 1

Wie es scheint, ist das Vermögen, Hamamelose für den Stoffwechsel wieder nutzbar zu machen, in der Natur nicht sehr weit verbreitet. So gelang es beispielsweise nicht, Hamamelose-abbauende Bakterien aus Komposterde zu isolieren. Die Isolierung solcher Organismen war nur aus hamamelosereichen Biotopen möglich, wie z. B. Erde aus dem Wurzelbereich von *Primula clusiana* oder aus Blättern dieser Pflanze.

Durch ein "direktes Plattenverfahren" wurde ein *Pseudomonas*-stamm (H 1) isoliert, der Hamamelose zu Hamamelonsäure oxidiert. Letztere tritt bei diesen Organismen als einziges Abbauprodukt der Hamamelose auf. Glucose wird unter den gleichen Bedingungen zu CO_2 abgebaut. Während offensichtlich Glucose für diese Bakterien eine vollwertige Nahrungsquelle darstellt, können sie Hamamelose nur als zusätzliche Energie- (d. h. Wasserstoff-), nicht aber als Kohlenstoffquelle nützen. Sie benötigen zum Wachstum außer Hamamelose weitere organische Substanzen. Im Falle der Anzucht in einem künstlichen Medium waren dies Citrat und Pepton. In natürlicher Umgebung, dem Wurzelbereich von *Primula clusiana*, sind es wohl organische Stoffe aus dem Humus. Es ist somit anzunehmen, daß bei der Zersetzung der abgeworfenen hamamelosehaltigen Blätter von *Primula clusiana* durch Mikroorganismen Hamamelonsäure auftritt. Es liegt nahe, zu vermuten, daß im Boden Bakterien leben, die Hamamelonsäure verwerten können.

Da Hamamelonsäure sehr leicht durch Luftsauerstoff oxidiert werden kann, wäre andererseits unter oxidierenden Bedingungen auch an eine "Verwitterung" dieser Zuckersäure zu denken, wobei dann die Sekundärprodukte wieder in einen mikrobiellen Stoffwechsel einbezogen werden könnten.

4.3. Der Abbau der Hamamelose durch *Kluyvera citrophila* Stamm 627

4.3.1. Der Weg des Kohlenstoffs

Bei der Oxidation von Hamamelose zu Hamamelonsäure bleibt das Kohlenstoffgerüst erhalten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es jedoch, Einblick zu gewinnen, wie das verzweigte Kohlenstoffskelett biologisch abgebaut wird.

Durch eine Anreicherungskultur, die mit einem Homogenat aus einem vergilbenden Primelblatt beimpft worden war, gelang es, Bakterien zu isolieren, die in der Lage sind, in einem Nährmedium zu wachsen, das neben anorganischen Salzen nur Hamamelose als organische Substanz enthält. Es handelt sich um Organismen, die der von Asai (1) beschriebenen Art *Kluyvera citrophila* sehr nahe stehen, sich von dieser aber gerade dadurch unterscheiden, daß sie Hamamelose abbauen können.

Unter aeroben Bedingungen bauen diese Organismen Hamamelose bis zum CO_2 ab. Dabei ließen sich keine Zwischenprodukte erfassen. *Kluyvera citrophila* 627 kann jedoch Hamamelose auch anaerob verwerten, wobei Lactat, Acetat, Formiat und Äthanol die dominierenden Abbauprodukte bei der Puffervergärung sind, während bei Kultur im Hochagar auch Gas gebildet wird. Es handelt sich dabei mit aller Wahrscheinlichkeit um H_2 und CO_2 , die durch die Formiat-Hydrogen-Lyase aus Formiat entstehen.

Die gleichen Produkte entstehen bei der Puffervergärung von Glucose durch *K. citrophila* 627, gleichgültig ob die Organismen auf Hamamelose oder auf Glucose angezogen worden waren.

Daraus kann geschlossen werden, daß der Abbauweg der Hamamelose in den Abbauweg der Glucose einmündet. Es wurde daher zunächst untersucht, über welchen Weg *K. citrophila* 627 Glucose abbaut. Die Markierung der Gärungsprodukte (Tab. 8) nach Fütterung von Glucose-1- ^{14}C und -6- ^{14}C wiesen eindeutig darauf hin, daß Glucose durch die Glycolyse zu Pyruvat abgebaut wird. Dieses kann zu Milchsäure reduziert oder durch

die Pyruvat-Formiat-Lyase in Formiat und Acetyl-Coenzym A gespalten werden. Letzteres kann über Acetyl-P zu Äthanol reduziert werden oder zu Essigsäure und Acetyl-Coenzym A gespalten werden.

Ist genügend CO_2 vorhanden, so kann Phosphoenolpyruvat carboxyliert werden, wobei dann Bernsteinsäure entsteht.

Die Frage, an welcher Stelle der Hamameloseabbau in die Glycolyse einmündet, wurde durch eine Markierungskinetik der Zwischenprodukte nach Applikation einer ^{14}C -Hamamelose von höchstmöglicher spezifischer Radioaktivität geklärt. Dabei sollte - bei gleicher Art des zeitlichen Markierungsverlaufs - die Reihenfolge der Markierung mit ^{14}C gleich der Reihenfolge des Auftretens der Zwischenprodukte sein. Fructose-P, Fructose-DP, Phosphoglycerinsäure werden rasch mit Radiokohlenstoff markiert, verlieren diesen aber wieder und sinken auf die sehr kleinen steady state-Werte ab. Es ergab sich dabei eine eindeutige Reihenfolge der Maxima im ^{14}C -Gehalt: Fructose-P - Fructose-DP - Phosphoglycerinsäure - "flüchtige Produkte".

Es ist klar, daß es sich bei der raschen ^{14}C -An- und Abreicherung in den genannten Verbindungen um ein Induktionsphänomen bei der Puffervergärung handelt, und daß, wie die später entnommenen Proben zeigen, der Pool dieser Verbindungen im steady state äußerst klein ist. Die Induktionsphase kommt auch in der anfangs viel rascheren Aktivitätsabnahme der eingesetzten Hamamelose zum Ausdruck

Ganz anders als bei den bisher besprochenen Phosphateestern verläuft die ^{14}C -Markierungskinetik von Hamamelose-P. Somit sagt die verhältnismäßig spät einsetzende Anreicherung von ^{14}C nichts über die Reihenfolge von Hamamelose-P innerhalb der Zwischenprodukte aus. Sein Verhalten wird von anderen Faktoren bestimmt: Offensichtlich ist zu Beginn der

Puffervergärung die Phosphorylierung der Hamamelose der limitierende Schritt des Hamameloseabbaus. Dies ist möglicherweise durch ATP-Mangel in den Zellen bedingt, da die Bakterien bei der Aufarbeitung zur Puffervergärung etwa 2 Std. ohne externe Energieversorgung waren. Nach 30 sec wird dann ein anderer Reaktionsschritt limitierend und es kommt zur Anreicherung von Hamamelose-P, dessen steady state-Pool wesentlich größer als der der übrigen Phosphat-ester ist. Welcher Reaktionsschritt im steady state limitierend ist, läßt sich nicht sicher sagen. Nach dem Kurvenverlauf der Zwischenprodukte kann man vermuten, daß dies die Umwandlung von Hamamelose-P zu Fructose-P ist.

Die Einmündungsstelle des Hamameloseabbaus in die Glycolyse ist wohl Fructose-DP und nicht Fructose-P, da dieses wahrscheinlich nicht als 6-Phosphat sondern als 1-Phosphat vorliegt. Für *K. citrophila* 627 müßte demnach eine Phosphofructokinase, wie man sie auch schon in den Muskeln und in der Leber von Säugetieren gefunden hat (24), und die für das Fructose-1-P spezifisch ist, postuliert werden. Glucose-P, Mannose-P und Mannit-P stellen wohl einen anabolischen Stoffwechselweg dar.

4.3.2. Energetische Betrachtungen

Die ATP-liefernden Schritte des aeroben und anaeroben Hamameloseabbaus sind identisch mit denen des Glucoseabbaus.

Bei der Vergärung von Hamamelose gewinnen die Bakterien bis zum Pyruvat 2 mol ATP. Die Reduktion des Pyruvats zu Milchsäure dient dann lediglich dem Ausgleich der Oxidations-Reduktions-Bilanz. Durch die Spaltung von Pyruvat in der Pyruvat-Formiat-Lyase-Reaktion geht dieser Acceptor für Reduktionsäquivalente verloren. Dies kann aber kompensiert werden, weil das entstehende Acetyl-Coenzym A teilweise

zu Äthanol reduziert werden kann, wozu zwei Reduktionsschritte notwendig sind. So kann bei ausgeglichener Wasserstoffbilanz Acetyl-Coenzym A über Acetyl-P gespalten werden, wobei die Energie der Anhydridbindung in Form von ATP festgelegt wird. Auf diese Weise gewinnen die Bakterien durch die Spaltung von 2 mol Pyruvat zusätzlich 1 mol ATP, womit eine theoretische Ausbeute von 3 mol ATP pro mol vergorener Hamamelose (Hexose) erzielt wird.

Unter aeroben Bedingungen wird vermutlich das Pyruvat, das der Glycolyse entstammt, oxidativ decarboxyliert und das dabei entstehende Acetyl-Coenzym A in den Tricarbonsäurecyclus eingeschleust. Über die Atmungskette wird dann die volle Energieausbeute von 38 ATP pro Hexose erreicht.

4.3.3. Über den Umlagerungsmechanismus von Hamamelose-Phosphat zu Fructose-Phosphat

Hinsichtlich der Problemstellung dieser Arbeit ist die interessanteste Reaktion des Abbaus (Abb. 12) die Umwandlung von Hamamelose-P zu Fructose-P. Hierbei wird das verzweigte Kohlenstoffgerüst der Hamamelose in ein geradkettiges übergeführt. Aus den bisherigen Ergebnissen lassen sich gewisse Rückschlüsse auf den Mechanismus dieser Umwandlung ziehen.

Wie auf Seite 74 ff erwähnt, sprechen folgende Befunde für eine intramolekulare Umlagerung von Hamamelose-2¹-P zu Fructose-1-P:

- a) Die uniforme Markierung des Mannit-P spricht nicht für das Auftreten von freien 3-C-Bruchstücken. Allerdings könnte die uniforme Markierung auch auf sekundäre Effekte zurückgeführt werden: Aus den bisherigen Ergebnissen ist zu schließen, daß Glucose-6-P, Mannose-P und Mannit-1-P einen anabolischen Stoffwechselweg darstellen. Da aber

Glucose-6-P nicht unmittelbar aus Fructose-1-P hervorgehen kann, ist der Umweg über Fructose-DP sehr wahrscheinlich. Fructose-DP unterliegt jedoch der Aldolasereaktion und die daraus resultierenden Triose-Phosphate werden durch die Triosephosphat-Isomerase ineinander übergeführt. Es ist daher möglich, daß eine unter Umständen vorhandene Ungleichverteilung der Radioaktivität im Fructose-1-P auf dem eben geschilderten Weg zum Mannit-P wieder verlorengeht.

- b) In den Bakterien und auch im in vitro-Versuch konnten niemals Triose oder Triose-P nachgewiesen werden.
- c) Bei Fütterung von positionsmarkierter Hamamelose konnte trotz einer gewissen Angleichung der Teilmarkierung der 3-C-Hälften noch eine Ungleichverteilung der Radioaktivität im geradkettigen Hexosemolekül festgestellt werden.

Die biogenetischen Beziehungen zwischen dem Kohlenstoffatom 2¹ der Hamamelose und dem Kohlenstoffatom 1 der Glucose sowie zwischen dem C₅ der Hamamelose und dem C₆ der Glucose sind zu erwarten, wenn man einen Umlagerungsmechanismus annimmt, ähnlich dem, der von Beck et al. (6) für die Biosynthese von Hamamelose postuliert wurde.

Von Hamamelose-2¹-P ausgehend sollte man bei einer derartigen Umlagerung die Bildung von Fructose-1-P erwarten. Tatsächlich konnte gerade das Auftreten dieses Phosphats wahrscheinlich gemacht werden.

Wie man heute weiß, trifft der oben angeführte Biosyntheseweg auf dem Niveau der Zuckermorphosphate nicht zu, da die Biosynthese der Hamamelose von Fructose-DP ausgeht (19).

Die bisherigen Daten über den Mechanismus des Hamameloseabbaus sind jedoch mit diesem Schema - nur eben in umgekehrter Richtung -

sehr wohl in Einklang zu bringen. Ob letztlich dieses Schema den Mechanismus bei der Umwandlung von Hamamelose-P in Fructose-P richtig wiedergibt, müssen jedoch erst weitere, auf diese spezielle Problematik hin geplante Versuche zeigen.

Es gibt aber keinen Hinweis darauf, daß der Abbau der Hamamelose entsprechend der Biosynthese über Hamamelose-DP verläuft, denn es konnte kein Hamamelose-DP gefunden werden.

5. Zusammenfassung

1. Es wurde der Metabolismus von Hamamelose in höheren Pflanzen durch Erstellung einer genauen Kohlenstoffbilanz untersucht. Dabei konnte nur die bekannte Reduktion der Hamamelose zu Hamamelit bestätigt werden, und dies auch nur bei *Primula elusiana*. In dieser Primel wurde dann diese Reduktion näher untersucht. Dabei zeigte sich, daß das Verhältnis von Hamamelose zu Hamamelit zum gleichen Zeitpunkt nach Pulsmarkierung mit Hamamelose- $U-^{14}C$ in den verschiedenen Pflanzenteilen unterschiedlich ist. Es ergaben sich folgende Halbwertszeiten der Reduktion: Im eben entrollten Blatt 2,5 - 3 Tage, in der restlichen Rosette 4 Tage, im Rhizom 19 Tage. Dies wird nicht im Sinne einer geringeren Reduktionsfähigkeit anderer Pflanzenorgane sondern durch Verzögerungen beim Transport von Hamamelose und Hamamelit erklärt. Die wahre Halbwertszeit kann demnach nur im Blatt, an das appliziert worden war, gemessen werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß Belichtung die Reduktion im Vergleich zum Dauerdunkel auf die doppelte Rate beschleunigt.
2. Es wurde unter den Pseudomonaden aus dem Wurzelbereich der Primeln ein Stamm gefunden und isoliert, der Hamamelose für das Wachstum nutzen kann. Es konnte aber gezeigt werden, daß diese Bakterien die Hamamelose lediglich zu Hamamelon-

säure oxidieren, sie also nicht als Kohlenstoffquelle sondern nur als zusätzliche Wasserstoff(Energie)-Quelle verwenden. Das Kohlenstoffgerüst der Hamamelose bleibt auch hierbei erhalten.

3. Es ist dann gelungen, von vergilbenden Primelblättern Bakterien zu isolieren, die auf Hamamelose als einzigem organischen Nährstoff wachsen. Diese Bakterien wurden als *Kluyvera citrophila*, einem nahen Verwandten von *Escherichia coli*, identifiziert. Sie unterscheiden sich aber von den ATCC-Stämmen von *K. citrophila* gerade dadurch, daß sie Hamamelose verwerten können. Sie wurden der Sammlung der gram-negativen Eubakterien am Institut für Milchwirtschaft, Weihenstephan, eingegliedert.

Bei Puffervergärung von Hamamelose und Glucose erhält man gleiche Abbauprodukte. Daraus wurde geschlossen, daß beide Zucker - wenigstens in einem gewissen Abschnitt - über den gleichen Stoffwechselweg abgebaut werden. Durch die Vergärung von positionsmarkierten Glucosen konnte gezeigt werden, daß der Katabolismus der Glucose über die Glycolyse verläuft. Aus Pyruvat entstehen dann Produkte wie sie bei der gemischten Säuregärung typisch sind, nämlich Äthanol, Essigsäure, Ameisensäure, Milchsäure und Bernsteinsäure.

Als Metaboliten des Hamameloseabbaus konnten Hamamelose-2¹-P, Fructose-1-P, Glucose-6-P, Mannose-P und Mannit-1-P sowie Fructose-DP und Phosphoglycerinsäure gefunden werden. Die Reihenfolge der Zwischenprodukte im Abbaupfad wurde durch eine Markierungskinetik nach Fütterung von ¹⁴C-Hamamelose ermittelt.

Der Weg des Kohlenstoffs bei Vergärung von Hamamelose ist in Abb. 12 dargestellt.

Glucose-6-P, Mannose-P und Mannit-1-P dürften Metaboliten eines anabolischen Stoffwechselwegs sein.

Die Umwandlung von Hamamelose-2¹-P in Fructose-1-P wurde näher untersucht. Als Mechanismus wird eine intramolekulare Umlagerung angenommen, da eine Spaltung in freie Triose und Triose-P nicht nachgewiesen werden konnte. Zudem wurden biogenetische Beziehungen zwischen dem C₂¹ der Hamamelose und dem C₁ der Glucose sowie zwischen C₅ und C₆ nachgewiesen. Diese Beziehungen sind zu erwarten, wenn die Umlagerung in Umkehrung des seinerzeit von Beck et al. (6) veröffentlichten Biosyntheseschemas von Hamamelose geschieht. Außerdem gelang die Umwandlung von Hamamelose-P zu Fructose-P auch in vitro, ohne daß freie Spaltprodukte nachgewiesen werden konnten.

Zur endgültigen Klärung des Umlagerungsmechanismus' sind weitere Untersuchungen notwendig.

6. Literaturverzeichnis

1. Asai, T., S. Okumura and T. Tsunoda: J. Gen. Appl. Microbiol. 3, 13 (1957)
2. Asai, T., H. Iizuka and K. Komagata: J. Gen. Appl. Microbiol. 8, 187 (1962)
3. Barker, S. A., E. J. Bourne, P. M. Grant, M. Stacey: Nature (London) 177, 1125 (1956)
4. Beck, E.: Z. Pflanzenphysiol. 57, 444 (1967)
5. Beck, E.: Habilitationsschrift Techn. Hochschule München 1967/68
6. Beck, E., J. Sellmair und O. Kandler: Z. Pflanzenphysiol. 58, 434 (1968)
7. Beck, E.: Z. Pflanzenphysiol. 61, 360 (1969)
8. Bell, D. J. in: Methods in Carbohydrate Chemistry Vol. I, Academic Press, New York and London 1962, S. 260
9. Bergmeyer, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße 1970
10. Bitter, J., F. Weigmann und H. Habs: Münchener med. Wschr. 73, 940 (1926)
11. Bobbitt, J. M.: Adv. Carbohydrate Chem. 11, 1 (1956)

12. Breed, R. S., E. G. D. Murray and N. R. Smith: Bergey's
Manual of Determinative Bacteriology,
Williams and Wilkins, Baltimore 1957
13. Cifonelli, J. A. und F. Smith: Analytic. Chem. 26,
1132 (1954)
14. Eickenbusch, J.D., J. Sellmair und E. Beck: Z. Pflanzen-
physiol. 65, 24 (1971)
15. Endo, S.: Biochem. Z. 296, 56 (1938)
16. Folin, O.: J. Biol. Chem. 82, 83 (1929)
17. Frahn, J. L. and J. A. Mills: Chem. Ind. 578 (1956)
18. Gibbs, M., P. K. Kindel and M. Busse in: Methods in
Carbohydrate Chemistry Vol. II, Academic
Press, New York and London 1963, S. 496
19. Gilck, H.: Dissertation Universität München 1972
20. Grüttner, F.: Arch. Pharm. 236, 278 (1898)
21. Gunsalus, J. C., B. L. Horecker, W. A. Wood: Bacteriol.
Rev. 19, 79 (1955)
22. Hirs, C. H. W., S. Moore and W. H. Stein: J. Biol. Chem.
195, 669 (1952)
23. Kalberer, F. und J. Rutschmann: Helv. chim. Acta 44, 1956
(1961)
24. Mahler, H. R. and E. H. Cordes: Biological Chemistry,
Harper and Row, New York, Evanston, London
1966, S. 423
25. Kuehl, F. A. in: Methods in Carbohydrate Chemistry Vol. I,
Academic Press, New York and London 1962,
S. 268
26. Lemieux, R. U. in: Methods in Carbohydrate Chemistry
Vol. I, Academic Press, New York and London
1962, S. 45

27. Nakayama, H., G. G. Midwinter and L. O. Krampitz:
Arch. Biochem. Biophys. 143, 526 (1971)
28. Neish, A. C.: Analytical Methods for Bacterial Fermentations, National Research Council of Canada, Report No. 46/8/3 II 1952
29. Porath, J.: Nature (London) 175, 478 (1955)
30. Ramsay, L. L. and W. J. Patterson: J. Assoc. Agric. Chem. 31, 139 (1948)
31. Scherpenberg, H. van, W. Gröbner und O. Kandler: Festschrift K. Mothes zum 65. Geburtstag, VEB Gustav Fischer, Jena 1965, S. 387
32. Schleifer, K. H. und O. Kandler: Archiv für Mikrobiologie 57, 335 (1967)
33. Schmidt-Lorenz, W. in: Anreicherungskultur und Mutantenauslese, Zbl. Bakt. 1. Abt. Suppl. 1 Fischer, Stuttgart 1965, S. 270
34. Sellmair, J.: Dissertation Techn. Hochschule München 1968
35. Sellmair, J., E. Beck und O. Kandler: Z. Pflanzenphysiol. 59, 70 (1968)
36. Sellmair, J. und O. Kandler: Z. Pflanzenphysiol. 63, 65 (1970)
37. Stephenson, M.: Ergeb. Enzymforsch. 6, 139 (1937)
38. Stokes, J. L.: J. Bacteriol. 57, 147 (1949)
39. Thanbichler, A., H. Gilck und E. Beck: Z. Naturforsch. 26 b 912 (1971)
40. Tikka, J.: Biochem. Z. 279, 264 (1935)
41. Trevelyan, W., D. D. Procter and J. S. Harrison: Nature (London) 166, 444 (1950)
42. Varner, J. E. in: Methods in Enzymology III, Academic Press, New York 1957, S. 397

44. Wolfrom, M. L. and A. Thompson in: Methods in Carbohydrate Chemistry Vol. II, Academic Press, New York and London 1963, S. 65
44. Wolin, M. J.: Science 146, 775 (1964)
45. Wood, W. A. in: The Bacteria II, Academic Press, New York 1961, S. 85
46. Shemyakin, M. M., A. S. Khoklov und M. N. Kolosov:
Dokl. Akad. Nauk Uz. SSR 85, 1301 (1952);
ref. C. A. 47, 4292 a (1953)

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. E. Beck am Institut für Angewandte Botanik der Technischen Hochschule München und am Botanischen Institut der Universität München angefertigt.

Herrn Professor Beck danke ich sehr herzlich für die wertvollen Ratschläge und sein großes Interesse an meiner Arbeit.

Dank schulde ich auch Herrn Professor Dr. O. Kandler für die finanzielle Unterstützung, die mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. F. Schötz für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen und bei Herrn Dr. A. Kleeberger vom Institut für Milchwirtschaft Weißenstephan für die Durchführung physiologischer Tests zur Identifizierung der Bakterien.

Lebenslauf

Geboren wurde ich am 9. September 1941 in München als dritter Sohn des Ehepaares Anton und Maria Thanbichler.

Nach dem Besuch der Volksschule in München-Trudering trat ich 1952 in die Maria-Theresia-Oberrealschule in München über, an der ich 1961 die Reifeprüfung ablegte.

Ein Studium generale an der Phil.-theol. Hochschule Freising schloß ich mit der Admissionsprüfung ab. Dann wechselte ich an die Universität München, wo ich Leibeserziehung, Biologie und Chemie studierte. Dem Staatsexamen in Biologie und Leibeserziehung unterzog ich mich im Herbst 1968 und arbeitete ab Januar 1969 zuerst am Institut für Angewandte Botanik der Technischen Hochschule, dann am Botanischen Institut der Universität München an der vorliegenden Dissertation.

Seit 20. September 1972 bin ich Studienreferendar am Erasmus-Grasser-Gymnasium München.

Im August 1967 heiratete ich Fräulein Johanna Gerold.
Am 31. Oktober 1968 wurde unsere Tochter Karin geboren.

